

## TENT COOPERATION TRE, Y

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

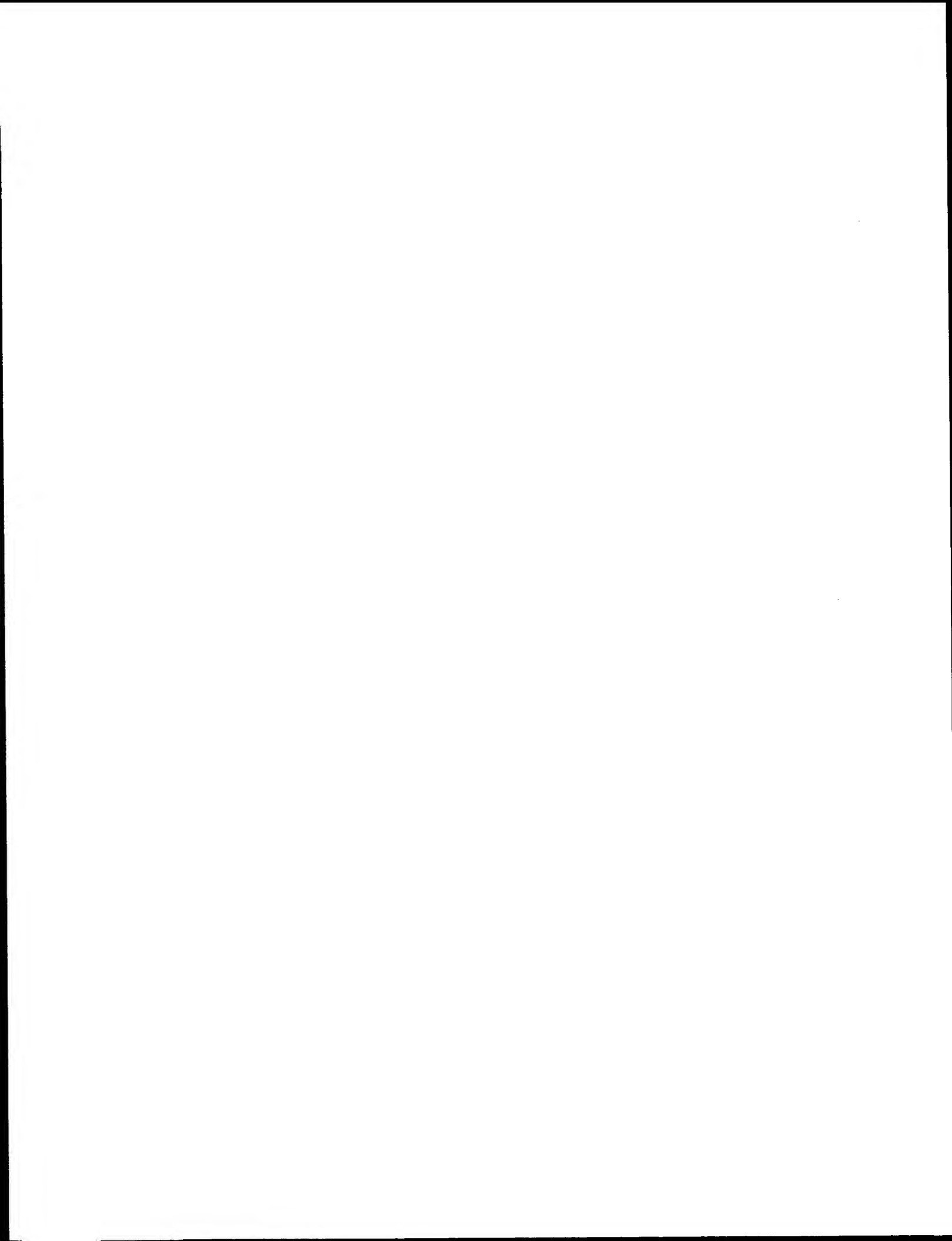
To:

MUROTA, Rikio  
Sankyoseiko-Sukai Building, 8th  
floor  
101, Edomachi  
Chuo-ku  
Kobe-shi  
Hyogo 650-0033,  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 11 October 2000 (11.10.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 9904-PT1	
International application No. PCT/JP99/02205	International filing date (day/month/year) 23 April 1999 (23.04.99)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. 2-6, Dojimahama 1-chome Kita-ku Osaka-shi Osaka 530-0004 Japan (all designated States except US)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD. 2-6, Dojimahama 1-chome Kita-ku Osaka-shi Osaka 530-0004 Japan (JP)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Susumu Kubo
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



## PCT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 04 November 1999 (04.11.99)	
International application No.: PCT/JP99/02205	Applicant's or agent's file reference: 9904-PT1
International filing date: 23 April 1999 (23.04.99)	Priority date: 24 April 1998 (24.04.98)
Applicant: BABA, Toshiyuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

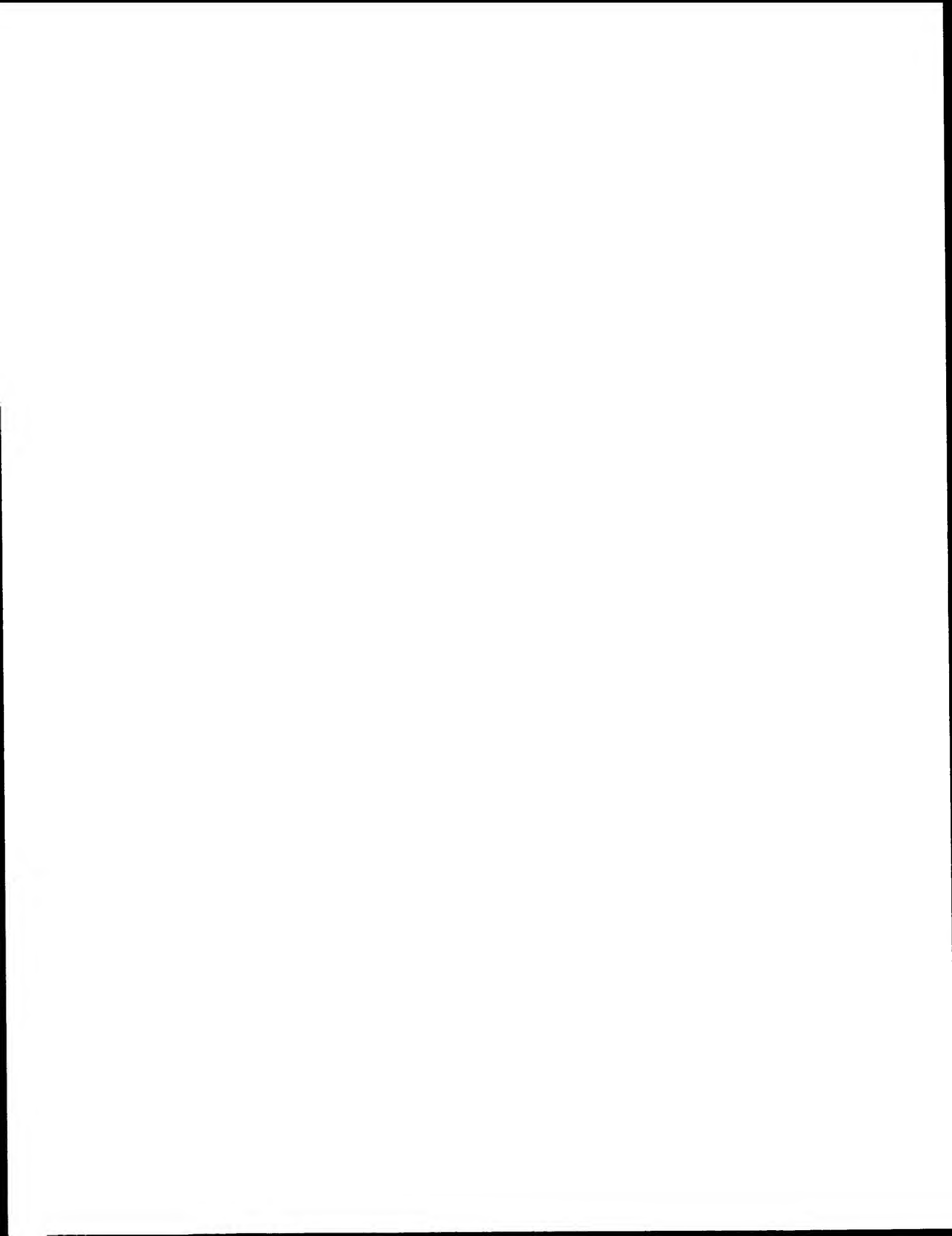
☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

16 July 1999 (16.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---







## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 9/96</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/55850</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年11月4日(04.11.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/02205  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年4月23日(23.04.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/131159 1998年4月24日(24.04.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 国際試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION)[JP/JP] 〒651-0083 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号 Hyogo, (JP) 旭化成工業株式会社 (ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.)(JP/JP) 〒530-0004 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 馬場利幸(BABA, Toshiyuki)[JP/JP] 田畑光正(TABATA, Hiromasa)[JP/JP] 永松 剛(NAGAMATSU, Katashi)[JP/JP] 渡津吉史(WATAZU, Yoshifumi)[JP/JP] 〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2 国際試薬株式会社内 Hyogo, (JP)		青木亮治(AOKI, Ryoji)[JP/JP] 〒410-2321 静岡県田方郡大仁町三福632番の1 旭化成工業株式会社内 Shizuoka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 室田力雄(MUROYA, Rikio) 〒650-0033 兵庫県神戸市中央区江戸町101番地 三共生興スカイビル8階 Hyogo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54)Title: METHOD FOR STABILIZING ENZYMES AND ENZYME COMPOSITIONS</b>  <b>(54)発明の名称</b> 酵素の安定化方法及び酵素組成物  <b>(57) Abstract</b> A method aiming at accurately and stably effecting medical examinations with the use of aspartate aminotransferase or alanine aminotransferase by stabilizing the aspartate aminotransferase or alanine aminotransferase in media. Valine and proline are added to the media (serum, buffer, etc.) as a component for stabilizing aspartate aminotransferase or alanine aminotransferase contained therein.		

媒体中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼを安定化させることで、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼを用いた医療上の検査を正確に安定して行うことを目的とした方法であり、血清や緩衝液からなる媒体中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼを安定化する安定化成分として、バリンやプロリンを含有させる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明 細 書

## 酵素の安定化方法及び酵素組成物

## 技術分野

本発明は、コントロール物質等において、媒体中に含まれる酵素を安定化する方法及び酵素組成物に関する。前記コントロール物質は、例えば人の血液中に含まれる酵素の量を検出する検査等において、一定量の酵素を成分として含有させたものをコントロール物質として用い、このコントロール物質を検出装置にかけることで、その検出装置が酵素等の正しい値を検出できる状態にあるか否かを検証し、或いはコントロール物質の検出数値を予め得ておくことで、実際の被検査体において得られた検出数値から正確な酵素の量を比例配分等によって得るのに用いられている。

## 背景技術

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (Aspartate aminotransferase EC 2. 6. 1. 1、以下ASTと略す) は、アスパラギン酸及び $\alpha$ -ケトグルタル酸からグルタミン酸及びオキザロ酢酸を生成する酵素で、心臓、肝臓、骨格筋に多く存在し、急性肝炎、慢性肝炎、心筋梗塞などの診断に有用な指標になる。

また、アラニンアミノトランスフェラーゼ (Alanine aminotransferase EC 2. 6. 1. 2、以下ALTと略す) はアラニン及び $\alpha$ -ケトグルタル酸からグルタミン酸及びピルビン酸を生成する酵素で、肝臓、腎臓、心臓に多く存在し、ASTと同様に臨床診断に有用な指標である。

これら A S T 及び A L T の血液中に含まれる量を検出するために行われる日常検査等においては、コントロール物質を用いて行う場合が多い。

従ってコントロール物質は、日常的な検査における検査値の安定性や信頼性を保証する上で、また精密且つ高度な技術が要求される臨床試験を行う上で、その取り扱いが重要となってきた。例えば、人の血液中に含まれる A S T や A L T の数値を検出する場合には、A S T や A L T を含有させたコントロール物質を用いることになるが、上記したコントロール物質の役割を十分に果たすためには、コントロール物質に含有させた不安定な酵素である A S T や A L T の酵素活性を十分に安定化させる必要がある。

このような観点から、コントロール物質中に含有せられた酵素の安定化を図る従来技術が、特開昭 5 5 - 1 4 1 1 9 4 号公報、特開昭 5 6 - 1 4 8 2 9 1 号公報、特開昭 5 7 - 4 5 4 5 3 号公報等に関示されている。これらの従来技術においては、安定化成分として、エチレングリコール、ショ糖或いはグリセリンなどが用いられている。

また、アミノ酸を用いた酵素の安定化については、ハロルド等 (H a r o l d L. S e g a l e t. a l. B i o c h e m i c a l a n d B i o p h y s i c a l R e s e a r c h C o m m u n i c a t i o n s, V o l. 3 0 (1), P. 6 3 ~ 6 8, 1 9 6 8) に代表されるように、過去から研究されてきた。

更に、コントロール物質の濁度を減少させるためにアミノ酸を用いた報告もあるが、何れにせよアミノ酸は蛋白質の変性を防ぐことができると考えられている。

しかしながら、上記エチレングリコール、ショ糖或いはグリセリン等の従来の安定化剤においては、その効果を発揮させるためには高濃度に

する必要があった。即ち、エチレングリコールでは  $5 \text{ mol/L}$  程度、グリセリンでは  $3.3 \text{ mol/L}$  程度と添加濃度が高くなり、またショ糖では  $1 \sim 10\%$  添加する必要が生じるため、コントロール物質そのものが高比重且つ／または高粘性となり、パラメータとなるべきコントロール物質がヒト血清とは異なる物理的性質を持つといった問題が生じたのである。そしてこのような問題は、コントロール物質を近年の自動分析機に適用した場合に、サンプリングの精度が通常のヒト血清と異なることから機種間或いは施設間で測定値に差異が生じるという要因となって現れる等、コントロール物質本来の目的を達成できない状況を生じせている（日本臨床化学会、学術連絡委員会、臨床化学 Vol. 25 (2), P. 135～148, 1996）。

#### 発明の開示

そこで本発明者らは、このような問題を解決すべく、コントロール物質の濁度や蛋白質の変性に対して果たすアミノ酸の役割等の事実を出発点として、鋭意研究を重ねた結果、コントロール物質等に含まれる、特にASTやALTの酵素を安定化させるものとして、特にバリン、プロリンが当該酵素を安定化させることを見出し、本発明の酵素の安定化方法及び酵素組成物を完成するに至った。

即ち本発明の酵素の安定化方法の第1の特徴は、血清及び緩衝液からなる群より選ばれる少なくとも1種の媒体中に、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼとアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素を安定化する安定化成分として、バリンとプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方を含有させることである。ただし、安定化の対象がアラニンアミノトランスフェラーゼでありアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを含まない場合、安定化

成分として、プロリンを単独で用いる場合には、該プロリンを  $100 \text{ mmol/L}$  を超えて含有させる。

また本発明の酵素の安定化方法の第2の特徴は、上記第1の特徴に加えて、バリンとプロリンのうちバリン単独とする場合はその含有量を  $0.5 \sim 100 \text{ mmol/L}$  とすることである。

また本発明の酵素の安定化方法の第3の特徴は、上記第1の特徴に加えて、バリンとプロリンを組合せて用いる場合は、バリン含有量を  $5 \sim 20 \text{ mmol/L}$ 、プロリン含有量を  $10 \sim 500 \text{ mmol/L}$  とすることである。

また本発明の酵素の安定化方法の第4の特徴は、上記第1の特徴に加えて、バリンとプロリンのうちプロリンを単独でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの安定化に用いる場合には、その含有量を  $0.5 \sim 500 \text{ mmol/L}$  とすることである。

また本発明の酵素の安定化方法の第5の特徴は、上記第1の特徴に加えて、血清または緩衝液が、可溶性蛋白質を含む緩衝液であることである。

また本発明の酵素の安定化方法の第6の特徴は、上記第5の特徴に加えて、可溶性蛋白質がアルブミン及びゼラチンからなる群より選ばれる少なくとも1種の可溶性蛋白質であることである。

また本発明の酵素の安定化方法の第7の特徴は、上記第6の特徴に加えて、アルブミンの濃度は  $0.5 \sim 15$  重量%であることである。

また本発明の酵素の安定化方法の第8の特徴は、上記第6の特徴に加えて、ゼラチンの濃度は  $0.5 \sim 15$  重量%であることである。

また本発明の酵素組成物の特徴は、血清及び緩衝液からなる群より選ばれる少なくとも1種の媒体に対して、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼとアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれ

る少なくとも1種の酵素と、バリンとプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方からなる前記酵素の安定化成分とが含有せられていることである。ただし、含有する安定化成分がプロリンで、且つ含有する酵素がアラニンアミノトランスフェラーゼでアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを含まない場合のプロリン含有量は100 mmol/Lを超えるものとする。

上記において、媒体は、酵素や安定化成分を溶かし或いは分散させる溶媒や分散媒等の母相或いは母材をいい、媒体に酵素と安定化成分を溶かし或いは分散させたものをコントロール物質として用いることができる。コントロール物質の媒体としては、例えば検出対象がヒト血清中に含まれるものである場合には、コントロール物質の媒体もヒト血清、或いはそれに処理を加えた類似のものを用いるのが好ましい。即ち、検査対象物に近い性質のものをコントロール物質の媒体として選ぶのが好ましい。

前記媒体としては、血清や緩衝液を用いることができる。血清とは、広い意味において、ヒト血清やその他の動物の血清、或いはそれらに処理を加えたものとする。前記血清や緩衝液は、可溶性蛋白質溶液を含む緩衝液とすることができる。以下、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼをAST、アラニンアミノトランスフェラーゼをALTと略す。

上記ASTやALTを安定化する安定化成分としてのバリン、プロリンは、バリン単独で用いる場合、プロリン単独で用いる場合及びバリンとプロリンの両方を組み合わせて用いる場合の3つの場合がある。ただし、これらの安定化成分は、AST、ALTの各単独或いは両組み合わせを安定化するのに用いられて、良好な効果を発揮するのは勿論である。が、他の酵素に対する安定化成分として用いる場合も本発明の範囲内である。またプロリンをALT安定化に単独で用いる場合は、100 m

m o l / L を超える量でプロリンの量を用いるのが好ましい。

また上記の特徴において、媒体中に酵素として A S T を含ませたものは、コントロール物質として、典型的には、人の血液中に含まれる A S T 量を検出する場合に用いることができる。また媒体に酵素として A L T を含ませたものは、コントロール物質として、典型的には、人の血液中に含まれる A L T の量を検出する場合に用いられる。

コントロール物質に含ませる A S T、A L T の起源は特に限定しないが、例えばウシ心臓、ブタ心臓、ヒト心臓、血清、赤血球、尿等の生体材料、さらにヒト細胞を培養したもの、或いはヒト由来遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することにより得ることができる。この場合 A S T、A L T の含有量は、それぞれ 5 ~ 1 0 0 0 U / L とする。が、好ましくは 3 0 ~ 5 0 0 U / L とする。

上記特徴において、媒体が血清である場合には、コントロール物質は、その血清に酵素と安定化成分としてのアミノ酸を含有している。

また上記特徴において、媒体が緩衝液である場合としては、例えばウシ血清アルブミンを溶かした B E S 緩衝液を用いることができる。が、実際に検査装置にかけられる検査対象物（厳密には検査対象物の媒体）の種類や状態に対応して、物理的に或いは化学的に似た性質を持つようにするため、種々の物質を緩衝液に溶解したものをを用いることができる。本発明はこの様な場合も含むものとする。

前記本発明で用いられる緩衝液としては、例えば、p H 6 ~ p H 8、5 の間に適宜に調整できる有機アミン系緩衝液、グッド緩衝液やその他に、クエン酸-第 2 リン酸ナトリウム系、塩酸-ベロナールナトリウム-酢酸ナトリウム系、第 1 リン酸カリウム-第 2 リン酸ナトリウム系、第 1 リン酸カリウム-ホウ砂系、第 1 リン酸カリウム-水酸化ナトリウム系、塩酸-コリジン系、塩酸-ベロナールナトリウム系、塩酸-トリ



スアミノメタン系、塩酸－ホウ砂系、ホウ酸－炭酸ナトリウム系、ホウ酸－ホウ砂系、塩酸－アミノメチルプロパンジオール系、塩化アンモニウム－アンモニア系、グリシン－水酸化ナトリウム系、ホウ酸－水酸化ナトリウム系、塩酸－ジメチルグリシンナトリウム系、ホウ砂－水酸化ナトリウム系、ホウ砂－炭酸ナトリウム系、セーレンセン緩衝液、グリシン－塩化ナトリウム－塩酸系、第2クエン酸ナトリウム－塩酸系、第2クエン酸ナトリウム－水酸化ナトリウム系、ホウ砂－塩酸ナトリウム系、ミカエリス緩衝液、ベロナールナトリウム－酢酸ナトリウム－塩酸系、クラークールブス緩衝液、ホウ酸－塩酸カリウム－水酸化ナトリウム系、アトキンズ－パルチン緩衝液、パリティッシュ緩衝液、コルトホフ緩衝液、マックイルベイン緩衝液、ハスチンガーセンドロイ緩衝液、プリトニーロビンソン緩衝液、マイレン酸塩緩衝液、トリス－マイレン酸塩緩衝液、ベロナール緩衝液、ベロナール－酢酸塩緩衝液等の生化学用緩衝液がある。これらの緩衝液以外であっても、pH 6～8.5で緩衝能を有するものであれば何ら限定されない。

また前記有機アミン系緩衝液としては、例えば、ジエタノールアミン緩衝液、2－エチルアミノエタノール緩衝液、2－アミノ－2－メチル－1－プロパノール、N－メチル－D－グルカミン等が挙げられる。

更に前記グッド緩衝液としては、例えば、MES (2－(N－Morpholino)ethanesulfonic acid) 緩衝液、Bis-Tris (Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane) 緩衝液、ADA (N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid) 緩衝液、PIPES (Piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid) 緩衝液、ACES (N-(2-Acetamido)-2-aminoethane

sulfonic acid) 緩衝液、MOPSO (3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid) 緩衝液、BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid) 緩衝液、MOPS (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid) 緩衝液、TES (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid) 緩衝液、HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 緩衝液、DIPSO (3-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid) 緩衝液、TAPSO (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-hydroxy-3-aminopropanesulfonic acid) 緩衝液、POPSO (Piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid) 緩衝液、HEPPSO (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-hydroxypropane-3-sulfonic acid) 緩衝液、EPPS (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-3-propanesulfonic acid、別名HEPPS) 緩衝液、Tricine (Tris(hydroxymethyl)methylglycine) 緩衝液、Bicine (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine) 緩衝液、TAPS (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid) 緩衝液、CHES (2-(Cyclohexylamino

) ethanesulfonic acid) 緩衝液、CAPSO (3-N-Cyclohexylamino-2-hydroxypropanesulfonic acid) 緩衝液、CAPS (3-Cyclohexylaminopropanesulfonic acid) 緩衝液等が挙げられる。

前記有機アミン系緩衝液を用いる場合は、20 mM～2 Mの濃度、好ましくは20 mM～1 Mの濃度、最適には20 mM～500 mMの濃度に調整した水性媒体として用いれば良い。また、好適な水性媒体としては水、具体的には精製水が挙げられ、適宜に補酵素、可溶性塩類、界面活性剤、安定化剤や防腐剤などを含有しても良い。

また前記グッド緩衝液または生化学用緩衝液を用いる場合は、20 mM～1 Mの濃度、好ましくは20 mM～500 mMの濃度、最適には20 mM～300 mMの濃度に調整して用いれば良い。

上記特徴において、媒体が可溶性蛋白質溶液である場合としては、BSA、ヒト血清アルブミン(HSA)、ゼラチン等の水溶液があげられるが、これらを1種または2種以上組合せて使用することができる。この場合、アルブミンとゼラチンの濃度は、それぞれ0.5～15重量%が好ましい。更に、媒体が血清である場合でも上記緩衝液を適時用いることができる。

上記したバリン或いはプロリンを用いて酵素の安定化を図る場合には、多量のバリン、プロリンを溶媒に添加することなく、低濃度で、よってコントロール物質が高比重、高粘性となることなく、酵素の安定化を図ることができる。さらにバリン、プロリンはAST、ALT以外の酵素、例えば、アルカリホスファターゼ(ALP) (EC. 3. 1. 3. 1)、クレアチンキナーゼ(CK) (EC. 2. 7. 3. 2)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH) (EC. 1. 1. 1. 27)、γ-グルタミ

ルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP) (EC. 2. 3. 2. 2) の安定化に負の影響を及ぼすものではなかった。尚、前記各酵素の添加量は、ALPが9～6500 U/L、特に好ましくは45～1300 U/L、CKが6～4000 U/L、特に好ましくは30～800 U/L、LDHが8～4000 U/L、特に好ましくは40～800 U/L、 $\gamma$ -GTPが2～1200 U/L、特に好ましくは10～800 U/Lとすることができる。

前記バリリン、プロリンをASTとALTからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素を含むコントロール物質の安定化成分として用いる場合、バリリン単独の場合の含有量は0.5～100 mmol/Lとする。そしてより好ましくは、バリリンの含有量を10～20 mmol/Lとする。このような範囲とすることで安定化の効果が良好で、しかも物理的・化学的性質も検査対象である血清と近いものとすることができる。

プロリン単独の場合の含有量は0.5～500 mmol/Lとする。そしてより好ましくは、プロリンの含有量を100～500 mmol/Lとする。但しALTの安定化 (ASTを含まない場合) のためにプロリンを単独で用いる場合は、100 mmol/Lを超える量のプロリンを含有させるのが好ましく、より好ましくは200～500 mmol/Lで、最適には300～500 mmol/Lである。

またバリリンとプロリンを組み合わせる場合の含有量は、バリリンは5～20 mmol/L、プロリンは10～500 mmol/Lとし、組み合わせられた総量は15～520 mmol/Lとする。

以上のような範囲の含有量とすることで、安定化の効果が良好で、しかも物理的・化学的性質も検査対象である血清と近いものにすることができる。よって得られるコントロール物質の物理的・化学的性質を常に検査対象である血清に近似させ、且つ安定性を確保することができ、得

られたデータの値の信頼性を得ることができると共に、検査を行う施設間等での差異を無くすることができる。

上記本発明の特徴による酵素の安定化方法によれば、バリリンとプロリンの各単独またはそれらの両方の含有により媒体中のAST若しくはALT又はその組み合わせにおける媒体中での変性を抑制し、安定化させることが可能となる。

またASTやALTを安定化成分により安定化させることが可能となり、それらをAST或いはALTを検出対象とする検査等において、安定した正確な検出データを得ることが可能となった。特に、前記AST或いはALTに対して、バリリン又はプロリン又はその組み合わせが安定化成分として用いられることで、それらバリリンやプロリンの少ない含有量でもってそれら酵素の安定化を十分に図ることができる。

また上記本発明の特徴による酵素の安定化方法によれば、媒体を血清とすることで、血清中に含まれるASTやALTの検出を行う場合、媒体である血清の中にASTやALTとその安定化成分であるバリリンやプロリンを一緒に加えたコントロール物質等を用いることができ、物理的、化学的に似た良好な環境下での検出が可能となる。

同様に、媒体を緩衝液とすることで、緩衝液という安定した媒体中において、ASTやALTを安定化成分であるバリリンやプロリンにより安定化させることができる。勿論、緩衝液には必要に応じて種々の成分を溶解させることで、検査対象物質（溶媒）と類似の物理的、化学的性質を有するコントロール物質を提供することができる。

また上記本発明の特徴による酵素の安定化方法において、バリリンとプロリンのうちバリリン単独とする場合はその含有量を0.5～100mmol/Lとすることで、AST、ALTの良好な安定化を図ることができる。

また上記本発明の特徴による酵素の安定化方法において、バリンとプロリンを組合せて用いる場合は、バリン含有量を $5 \sim 20 \text{ mmol/L}$ 、プロリン含有量を $10 \sim 500 \text{ mmol/L}$ とすることで、AST、ALTの良好な安定化を図ることができる。

また上記本発明の特徴による酵素の安定化方法において、バリンとプロリンのうちプロリンを単独でASTの安定化に用いる場合には、その含有量を $0.5 \sim 500 \text{ mmol/L}$ とすることで、ASTの良好な安定化を図ることができる。

また上記本発明の特徴による酵素の安定化方法において、血清または緩衝液が可溶性蛋白質を含む緩衝液である場合には、該可溶性蛋白質を含む緩衝液中であっても、AST、ALTを安定化成分であるバリンやプロリンにより安定化させることができる。

更に前記可溶性蛋白質がアルブミン及びゼラチンからなる群より選ばれる少なくとも1種の可溶性蛋白質である場合には、アルブミンやゼラチンを含む緩衝液中においても、AST、ALTを安定化成分であるバリンやプロリンにより安定化させることができる。この場合、アルブミンとゼラチンの濃度が、それぞれ $0.5 \sim 15$ 重量%である場合に好ましくAST、ALTを安定化させることができる。

また上記本発明の特徴による酵素の安定化方法において、血清及び緩衝液からなる群より選ばれる少なくとも1種の媒体中にALTを含有し、ASTを含有しない場合に、前記ALTを安定化する安定化成分としてプロリンを単独で用いる場合には、該プロリンを $100 \text{ mmol/L}$ を超えて含有させることで、ALTを良好に安定化することができる。

また上記本発明の酵素組成物によれば、血清及び緩衝液からなる群より選ばれる少なくとも1種の媒体に対して、ASTとALTからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素と、バリンとプロリンより選ばれた

アミノ酸の少なくとも一方からなる前記酵素の安定化成分とが含有せられていることで、A S T、A L T又はその両方が容易に変性せずに、安定した状態で存在することができる酵素組成物を提供することができる。よってこのような酵素組成物をコントロール物質として、A S TやA L Tを検出対象とする検査等に用いることで、安定した正確な検出データを得ることが可能となる。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により、バリリン、プロリンを安定化成分とし、A S TやA L Tを酵素成分としたコントロール物質の製造の例を説明する。

ヒト血清（トリナ社製（スイス国））を用い、これを予め56℃で4時間熱処理することにより、内因性の酵素を失活させた後、0.2μmのメンブランフィルターで除菌濾過する（これをヒト血清ベースと称する。）。このヒト血清ベース（媒体）に、例えば10mmol/Lのバリリンを溶解し、更にA S T又はA L Tを一定量溶解することで、バリリンを安定化成分としたA S T又はA L Tを含むコントロール物質を得ることができる。

また前記ヒト血清ベースに、例えば300mmol/Lのプロリンを溶解し、更にA S T又はA L Tを一定量溶解することで、プロリンを安定化成分としたA S T又はA L Tを含むコントロール物質を得ることができる。

同様に本発明の方法により、バリリン、プロリンを安定化成分とし、A S TやA L Tを酵素成分とし、緩衝液を媒体としたコントロール物質の製造の例を説明する。

20mmol/LのB E S緩衝液に、ウシ血清アルブミン（インタージェン社製（アメリカ））を3%含有させ、これを除菌濾過する（pH

7. 4、これをB S Aベースとする)。このB S Aベースに、例えば10 mmol/Lのバリンを溶解し、更にA S T又はA L Tを一定量溶解することで、緩衝液媒体中にバリンを安定化成分とし、A S T、A L Tを含むコントロール物質を得ることができた。

また前記B S Aベースに、例えば300 mmol/Lのプロリンを溶解し、更にA S T又はA L Tを一定量溶解することで、緩衝液媒体中にプロリンを安定化成分とし、A S T、A L Tを含むコントロール物質を得ることができた。

尚、本発明の方法を用いて得られるコントロール物質は通常の使用時において液体であるが、保存状態としては、凍結乾燥品、冷凍保存品、凍結液状品等、液体以外の状態であってもよい。

#### 実施例

以下、本発明の実施例を説明する。が、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例 1

コントロール物質中のA S T又はA L Tに対する各種アミノ酸の安定化効果の確認

媒体としてヒト血清ベースとB S Aベースをそれぞれ用い、それらの各媒体に対して安定化成分として、アミノ酸無添加のもの、アミノ酸としてバリンを10 mmol/L加えたもの、プロリンを10 mmol/L加えたもの、その他のアミノ酸を10 mmol/L加えたものを作り（但し、チロシンは1 mmol/L）、さらにそれらに対して、酵素としてA S Tを約100 U/Lになるように加え、また酵素としてA L Tを約100 U/Lになるように加えて、コントロール物質を作成した。



そして得られた各コントロール物質を45℃で4日間保持し、各コントロール物質に含まれるASTとALTの残存活性を測定した。

尚、使用するASTは旭化成工業株式会社製（製造番号T-70）のヒト肝遺伝子組換え体由来のもの（以下、r-ASTと称す）を用いた。また、ALTは旭化成工業株式会社製（製造番号T-71）のヒト肝遺伝子組換え体由来のもの（以下、r-ALTと略す）を用いた。また使用するヒト血清ベースは、ヒト血清を予め56℃で4時間熱処理して内因性の酵素を失活させた後、0.2μmのメンブランフィルターで除菌濾過したものを用いた。また使用するBSAベースは、3%BSA含有の20mmol/LのBES緩衝液を用いた。

ASTとALTの残存活性の測定は、ASTについては国際試薬株式会社製のAST試薬・L「コクサイ」を用いて測定した。またALTについては国際試薬株式会社製のALT試薬・L「コクサイ」を用いて測定した。

結果を表1に示す。

表1から明らかなように、バリンとプロリンがAST、ALTに対して好ましい安定化効果を示した。

## 実施例2

コントロール物質中のAST又はALTに対するバリンの安定化効果の確認

ヒト血清ベース、BSAベースにバリン及びr-AST、r-ALTを約100U/Lになるように加え、45℃で4日間保持し、残存活性を測定した。AST、ALTの活性測定は実施例1と同様に行った。

結果を表2に示す。

表2から明らかなように、BSAベースでは、バリン無添加の場合の

A S T、A L Tの残存率はそれぞれ53%、32%であるのに対して、バリンを0.5 mmol/L添加することによりA S T、A L Tの残存率がそれぞれ65%、38%となり安定性が向上した。またバリン濃度が10 mmol/Lの場合におけるA S T、A L Tの残存率は、それぞれ85%、62%であり、バリン濃度が20 mmol/Lの場合におけるA S T、A L Tの残存率は、それぞれ82%、65%であり、更にバリン濃度が100 mmol/Lの場合におけるA S T、A L Tの残存率は、それぞれ82%、65%であった。

またヒト血清ベースでも、同様にバリン無添加の場合のA S T、A L Tの残存率はそれぞれ41%、20%であったが、バリンを0.5 mmol/L添加することによりA S T、A L Tの残存率それぞれ47%、28%となり安定性が向上した。またバリン濃度が10 mmol/LのときのA S T、A L Tの残存率は、それぞれ71%、55%であり、バリン濃度が20 mmol/Lの場合におけるA S T、A L Tの残存率は、それぞれ73%、56%であり、更にバリン濃度が100 mmol/Lの場合におけるA S T、A L Tの残存率は、それぞれ72%、55%であった。

以上よりバリンの濃度は0.5~100 mmol/Lとするのが良く、より好ましくは10~20 mmol/Lとするのがよいことが判った。

### 実施例 3

コントロール物質中のA S T又はA L Tに対するプロリンの安定化効果の確認

媒体としてヒト血清ベースとB S Aベースをそれぞれ用い、それらの各媒体に対して安定化成分として、プロリン無添加のもの、プロリンを

それぞれ 0.5、10、100、300、500 mmol/L 加えたものを作り、さらにそれらに対して、酵素として r-AST を約 100 U/L になるように加え、また酵素として r-ALT を約 100 U/L になるように加えて、コントロール物質を作製した。そして得られた各コントロール物質を 45℃ で 4 日間保持し、各コントロール物質に含まれる AST と ALT の残存活性を測定した。AST、ALT の活性測定は実施例 1 と同様に操作を行った。その結果を表 3 に示す。

表 3 から明らかなように、BSA ベースでは、プロリン無添加の場合に AST、ALT の残存率がそれぞれ 53%、32% であるのに対して、プロリンを 0.5 mmol/L 添加することにより AST、ALT の残存率がそれぞれ 60%、41% となり、安定性が向上した。プロリンを 100 mmol/L 添加することにより、AST、ALT の残存率がそれぞれ 74%、69% となり、プロリン濃度が 300 mmol/L の場合の AST、ALT の残存率は、それぞれ 84%、84% であり、更にプロリン濃度が 500 mmol/L の場合の AST、ALT の残存率は、それぞれ 84%、85% であった。

またヒト血清ベースでも同様に AST、ALT のプロリン無添加のときの残存率は、それぞれ 41%、20% であったが、プロリンを 0.5 mmol/L 添加することにより AST、ALT の残存率がそれぞれ 49%、34% となり安定性が向上した。またプロリンを 100 mmol/L 添加することにより、AST、ALT の残存率がそれぞれ 67%、65% となり、プロリンを 300 mmol/L 添加することにより AST、ALT の残存率がそれぞれ 82%、83% となり、更にプロリン濃度が 500 mmol/L の場合の時の AST、ALT の残存率は、それぞれ 85%、88% であった。

以上よりプロリンの濃度は 0.5 ~ 500 mmol/L とするのが良

く、より好ましくは $100 \sim 500 \text{ mmol/L}$ とするのがよいことが判った。特にALTの安定化に対するプロリンの濃度については、 $100 \text{ mmol/L}$ を超え $2.5 \text{ mmol/L}$ までの濃度で適宜しようするのが好ましく、最適には $300 \sim 500 \text{ mmol/L}$ とするのがよいことが判った。

#### 実施例 4

コントロール物質中のAST、ALTに対するバリンとプロリンを組み合わせたときの安定化効果の確認

ヒト血清ベースにバリン、プロリン及びr-AST、r-ALTを約 $100 \text{ U/L}$ になるように加え、 $45^\circ\text{C}$ で4日間保存し、残存活性を測定した。AST、ALTの活性測定は実施例1と同様に操作を行った。その結果を表4に示す。

表4で明らかなように、アミノ酸無添加の場合のASTの残存率が41%であり、これに対してバリンを単独で $5 \text{ mmol/L}$ 添加したときの残存率が52%で、プロリンを単独で $10 \text{ mmol/L}$ 添加したときの残存率は54%となり、更にバリンを $5 \text{ mmol/L}$ とプロリンを $10 \text{ mmol/L}$ 添加したときの残存率は66%となり、それぞれのアミノ酸を単独で用いた場合より安定性が向上した。

また、アミノ酸無添加の場合のALTの残存率は20%であったが、バリンを単独で $5 \text{ mmol/L}$ 添加した場合の残存率は33%、プロリンを単独で $10 \text{ mmol/L}$ 添加した場合の残存率は43%となり、更にバリンを $5 \text{ mmol/L}$ とプロリンを $10 \text{ mmol/L}$ 添加したときの残存率は54%となり、それぞれのアミノ酸を単独で用いた場合より安定化が向上した。

またバリンを $20 \text{ mmol/L}$ に対してプロリンを $10 \text{ mmol/L}$

として組み合わせた場合のASTの残存率は78%で、ALTの残存率は79%、バリンを20mmol/Lに対してプロリンを100mmol/Lとして組み合わせた場合のASTの残存率は84%で、ALTの残存率は85%、バリンを20mmol/Lに対してプロリンを300mmol/Lとして組み合わせた場合のASTの残存率は90%で、ALTの残存率は92%、バリンを20mmol/Lに対してプロリンを500mmol/Lとして組み合わせた場合のASTの残存率は94%で、ALTの残存率は94%であった。

以上よりバリンとプロリンとを組み合わせて用いる場合には、バリンを5~20mmol/L、プロリンを10~500mmol/Lとするのがよく、組み合わせられた総量が15~520mmol/Lとするのがよいことが判った。またこの濃度では、比重、粘度等はヒト血清に近似したものであった。

#### 実施例 5

起源の異なるAST、ALTに対するバリン、プロリンの安定化効果の確認

ヒト血清ベースに安定化成分としてバリンを10mmol/L、プロリンを300mmol/L含有させたもの、及び含有させないものを作り、これらに対して起源の異なる幾つかのAST、ALTをそれぞれ約100U/Lになるように加え、コントロール物質を作製した。各コントロール物質を45℃で4日間保存し、残存活性を測定した、AST、ALTの活性測定は実施例1と同様に操作を行った。その結果を表5に示す。

表5から明らかなように、各種起源の異なるAST、ALTに対してもバリン、プロリンによる安定化効果があることがわかった。

### 産業上の利用可能性

本発明の酵素の安定化方法及び酵素組成物は、医療検査に用いられるコントロール物質に関わるものであり、血清中や緩衝液中或いは可溶性蛋白質溶液等の媒体中に含有せられるASTやALTを十分に安定化させることから、医療の臨床検査分野において正確で安定した検査値を得るための方法、或いは材料を提供することで、産業上の利用可能性がある。

表 1

安定化成分 アミノ酸 (10 mmol / L)	媒 体			
	B S A ベース		ヒト血清ベース	
	A S T 残 存率 (%)	A S T 残 存率 (%)	A S T 残 存率 (%)	A L T 残 存率 (%)
無添加	53	32	41	20
バリン	85	62	71	55
プロリン	73	61	54	35
アラニン	39	28	33	15
ロイシン	46	28	40	20
イソロイシン	50	28	42	18
メチオニン	48	31	40	20
トリプトファン	52	30	38	18
フェニルアラニン	53	31	40	19
グリシン	53	30	40	19
セリン	52	32	40	19
トレオニン	50	31	37	18
システイン	47	24	32	14
チロシン	49	31	40	18
アスパラギン	41	25	37	14
グルタミン	43	15	32	17
リジン	53	31	39	20
ヒスチジン	47	28	36	15
アルギニン	50	30	39	18
アスパラギン酸	32	23	20	13
グルタミン酸	31	28	25	15

表 2

安定化成分	媒 体			
バリン濃度 (mmol/L)	BSAベース		ヒト血清ベース	
	AST残 存率 (%)	ALT残 存率 (%)	AST残 存率 (%)	ALT残 存率 (%)
0	53	32	41	20
0.5	65	38	47	28
5	74	46	52	33
10	85	62	71	55
20	82	65	73	56
50	83	64	73	56
100	82	65	72	55

表 3

安定化成分	媒 体			
プロリン濃度 (mmol/L)	BSAベース		ヒト血清ベース	
	AST残 存率 (%)	ALT残 存率 (%)	AST残 存率 (%)	ALT残 存率 (%)
0	53	32	41	20
0.5	60	41	49	34
10	65	57	54	43
100	74	69	67	65
300	84	84	82	83
500	84	85	85	88



表 4

安 定 化 成 分		媒 体	
バリニン濃度 (mmol/L)	プロリン濃度 (mmol/L)	ヒト血清ベース	
		A S T 残 存 率 (%)	A L T 残 存 率 (%)
0	0	4 1	2 0
0	1 0	5 4	4 3
0	1 0 0	6 7	6 5
0	3 0 0	8 2	8 3
0	5 0 0	8 5	8 8
5	0	5 2	3 3
5	1 0	6 6	5 4
5	1 0 0	7 6	7 7
5	3 0 0	8 5	8 8
5	5 0 0	8 9	9 0
1 0	0	7 1	5 5
1 0	1 0	7 6	7 5
1 0	1 0 0	8 2	8 6
1 0	3 0 0	9 0	9 2
1 0	5 0 0	9 2	9 2
2 0	0	7 3	5 6
2 0	1 0	7 8	7 9
2 0	1 0 0	8 4	8 5
2 0	3 0 0	9 0	9 2
2 0	5 0 0	9 4	9 4

表 5

酵素名	由 来	残 存 率 (%)	
		安定化成分無し	安定化成分有り
A S T	ヒト肝遺伝子組換え体	4 1	9 0
A S T	ブタ心筋	4 4	9 3
A S T	ヒト心筋	4 3	9 4
A L T	ヒト肝遺伝子組換え体	2 0	9 2
A L T	ブタ心筋	2 1	9 1
A L T	ヒト心筋	2 0	9 0

## 請求の範囲

1. 血清及び緩衝液からなる群より選ばれる少なくとも1種の媒体中に、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼとアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素を安定化する安定化成分として、バリンとプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方を含有させることを特徴とする酵素の安定化方法。ただし、安定化の対象がアラニンアミノトランスフェラーゼでありアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを含有しない場合に、安定化成分としてプロリンを単独で用いる場合には、該プロリンを100 mmol/Lを超えて含有させる。
2. バリンとプロリンのうちバリン単独とする場合はその含有量を0.5～100 mmol/Lとすることを特徴とする請求項1に記載の酵素の安定化方法。
3. バリンとプロリンを組合せて用いる場合は、バリン含有量を5～20 mmol/L、プロリン含有量を10～500 mmol/Lとすることを特徴とする請求項1に記載の酵素の安定化方法。
4. バリンとプロリンのうちプロリンを単独でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの安定化に用いる場合には、その含有量を0.5～500 mmol/Lとすることを特徴とする請求項1に記載の酵素の安定化方法。
5. 血清または緩衝液が、可溶性蛋白質を含む緩衝液である請求項1に記載の酵素の安定化方法。
6. 可溶性蛋白質がアルブミン及びゼラチンからなる群より選ばれる少なくとも1種の可溶性蛋白であることを特徴とする請求項5に記載の酵素の安定化方法。

7. アルブミンの濃度は0.5～15重量%であることを特徴とする請求項6に記載の酵素の安定化方法。

8. ゼラチンの濃度は0.5～15重量%であることを特徴とする請求項6に記載の酵素の安定化方法。

9. 血清及び緩衝液からなる群より選ばれる少なくとも1種の媒体に対して、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼとアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素と、バリンとプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方からなる前記酵素の安定化成分とが含有せられていることを特徴とする酵素組成物。ただし、アラニンアミノトランスフェラーゼを含有し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼを含有しない場合に、安定化成分としてプロリンを単独で用いる場合には、該プロリンを100 mmol/Lを超えて含有させる。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N9/96

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N9/96

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 57-122795, A (Iwan Endore Modorobich), 30 July 1982 (30. 07. 82), Claims 21, 22 & EP, 49475, A & US, 4652524, A	1-9
A	JP, 55-141194, A (Beckman Instruments, Inc.), 4 November, 1980 (04. 11. 80), Claims 1, 7 & EP, 16573, A & US, 4325832, A	1-9
A	JP, 8-187095, A (Toyobo Co., Ltd.), 23 July, 1996 (23. 07. 96), Claims (Family: none)	1-9
A	JP, 60-224499, A (Toyobo Co., Ltd.), 8 November, 1985 (08. 11. 85), Claims (Family: none)	1-9
A	JP, 51-26284, A (Amano Seiyaku K.K.), 4 March, 1976 (04. 03. 76), Claims (Family: none)	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search  
6 July, 1999 (06. 07. 99)Date of mailing of the international search report  
13 July, 1999 (13. 07. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl <sup>6</sup> C12N 9/96			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl <sup>6</sup> C12N 9/96			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 57-122795, A (イバン・エンドレ・モドロビッチ) 30. 7月. 1982 (30. 07. 82) 特許請求の範囲第 2 1, 2 2 項 & EP, 49475, A & US, 4652524, A		1-9
A	JP, 55-141194, A (ベックマン・インストルメンツ・インコーポレー テッド) 4. 11月. 1980 (04. 11. 80) 特許請求の範囲第 1, 7 項 & EP, 16573, A & US, 4325832, A		1-9
A	JP, 8-187095, A (東洋紡績株式会社) 23. 7月. 1996 (23. 07. 96) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)		1-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 06. 07. 99		国際調査報告の発送日 13.07.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 60-224499, A (東洋紡績株式会社) 8. 11月. 1985 (08. 11. 85) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9
A	JP, 51-26284, A (天野製薬株式会社) 4. 3月. 1976 (04. 03. 76) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9



(Written Request)

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	_____
国際出願日	_____
(受付印)	_____
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	9904-PT1

第I欄 発明の名称

酵素の安定化方法及び酵素組成物

第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国際試薬株式会社

International Reagents Corporation

〒651-0083 日本国兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目

1番30号

1-30, Hamabe-dori 2-chome, Chuo-ku, Kobe-shi,

Hyogo 651-0083 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

078-231-4151

ファクシミリ番号:

078-232-0548

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

旭化成工業株式会社

Asahi Chemical Industry Co., Ltd.

〒530-0004 日本国大阪府大阪市北区堂島浜1丁目

2番6号

2-6, Dojimahama 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi,

Osaka 530-0004 JAPAN

この欄に記載した者は  
次に該当する:

☒ 出願人のみである。

☐ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続業に記載されている。

第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

9183 弁理士 室田力雄 MUROTA Rikio

〒650-0024 日本国兵庫県神戸市中央区海岸通6番地

建隆ビルII5階

5F., Kenryu Bldg. II, 6, Kaigan-dori, Chuo-ku, Kobe-shi,

Hyogo 650-0024 JAPAN

電話番号:

078-392-3470

ファクシミリ番号:

078-392-2508

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名:代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記特許内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。



## 第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この続票を使用しないときは、この用紙を附書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

馬場利幸 BABA Toshiyuki  
 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2  
 国際試薬株式会社内  
 c/o International Reagents Corporation,  
 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi,  
 Hyogo 651-2241 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

田畑光正 TABATA Hiromasa  
 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2  
 国際試薬株式会社内  
 c/o International Reagents Corporation,  
 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi,  
 Hyogo 651-2241 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

永松剛 NAGAMATSU Katashi  
 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2  
 国際試薬株式会社内  
 c/o International Reagents Corporation,  
 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi,  
 Hyogo 651-2241 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

渡津吉史 WATAZU Yoshifumi  
 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2  
 国際試薬株式会社内  
 c/o International Reagents Corporation,  
 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi,  
 Hyogo 651-2241 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☒ その他の出願人又は発明者が他の続票に記載されている。



## 第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

青木 亮治 AOKI Ryoji

〒410-2321 日本国静岡県田方郡大仁町三福632番の1  
旭化成工業株式会社内

c/o Asahi Chemical Industry Co., Ltd.

632-1, Mifuku, Ohitocho, Tagata-gun, Shizuoka 410-2321 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する：☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名)： 日本国 JAPAN

住所(国名)： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、  
次に該当する：☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名)：

住所(国名)：

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、  
次に該当する：☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名)：

住所(国名)：

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、  
次に該当する：☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名)：

住所(国名)：

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☒ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。



## 第V欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと：少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

## 広域特許

- ☐ **AP** **ARIPO**特許：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ **EA** ユーラシア特許：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EP** ヨーロッパ特許：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ **OA** **OAPI**特許：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

## 国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> <b>AL</b> アルバニア Albania                                       | <input type="checkbox"/> <b>LR</b> リベリア Liberia  |
| <input type="checkbox"/> <b>AM</b> アルメニア Armenia                                       | <input type="checkbox"/> <b>LS</b> レソト Lesotho   |
| <input type="checkbox"/> <b>AT</b> オーストリア Austria                                      | <input type="checkbox"/> <b>LT</b> リトアニア Lithuania   |
| <input type="checkbox"/> <b>AU</b> オーストラリア Australia                                   | <input type="checkbox"/> <b>LU</b> ルクセンブルグ Luxembourg  |
| <input type="checkbox"/> <b>AZ</b> アゼルバイジャン Azerbaijan                                 | <input type="checkbox"/> <b>LV</b> ラトヴィア Latvia  |
| <input type="checkbox"/> <b>BA</b> ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina                | <input type="checkbox"/> <b>MD</b> モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input type="checkbox"/> <b>BB</b> バルバドス Barbados                                      | <input type="checkbox"/> <b>MG</b> マダガスカル Madagascar   |
| <input type="checkbox"/> <b>BG</b> ブルガリア Bulgaria                                      | <input type="checkbox"/> <b>MK</b> マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> <b>BR</b> ブラジル Brazil   | <input type="checkbox"/> <b>MN</b> モンゴル Mongolia   |
| <input type="checkbox"/> <b>BY</b> ベラルーシ Belarus                                       | <input type="checkbox"/> <b>MW</b> マラウイ Malawi   |
| <input type="checkbox"/> <b>CA</b> カナダ Canada  | <input type="checkbox"/> <b>MX</b> メキシコ Mexico   |
| <input type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> <b>NO</b> ノルウェー Norway  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> 中国 China                                 | <input type="checkbox"/> <b>NZ</b> ニュー・ジーランド New Zealand                                       |
| <input type="checkbox"/> <b>CU</b> キューバ Cuba   | <input type="checkbox"/> <b>PL</b> ポーランド Poland  |
| <input type="checkbox"/> <b>CZ</b> チェッコ Czech Republic                                 | <input type="checkbox"/> <b>PT</b> ポルトガル Portugal  |
| <input type="checkbox"/> <b>DE</b> ドイツ Germany   | <input type="checkbox"/> <b>RO</b> ルーマニア Romania   |
| <input type="checkbox"/> <b>DK</b> デンマーク Denmark                                       | <input type="checkbox"/> <b>RU</b> ロシア Russian Federation                                      |
| <input type="checkbox"/> <b>EE</b> エストニア Estonia                                       | <input type="checkbox"/> <b>SD</b> スーダン Sudan  |
| <input type="checkbox"/> <b>ES</b> スペイン Spain  | <input type="checkbox"/> <b>SE</b> スウェーデン Sweden   |
| <input type="checkbox"/> <b>FI</b> フィンランド Finland                                      | <input type="checkbox"/> <b>SG</b> シンガポール Singapore  |
| <input type="checkbox"/> <b>GB</b> 英国 United Kingdom                                   | <input type="checkbox"/> <b>SI</b> スロヴェニア Slovenia   |
| <input type="checkbox"/> <b>GD</b> グレナダ Grenada  | <input type="checkbox"/> <b>SK</b> スロヴァキア Slovakia   |
| <input type="checkbox"/> <b>GE</b> グルジア Georgia  | <input type="checkbox"/> <b>SL</b> シェラ・レオネ Sierra Leone  |
| <input type="checkbox"/> <b>GH</b> ガーナ Ghana   | <input type="checkbox"/> <b>TJ</b> タジキスタン Tajikistan   |
| <input type="checkbox"/> <b>GM</b> ガンビア Gambia   | <input type="checkbox"/> <b>TM</b> トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input type="checkbox"/> <b>HR</b> クロアチア Croatia                                       | <input type="checkbox"/> <b>TR</b> トルコ Turkey  |
| <input type="checkbox"/> <b>HU</b> ハンガリー Hungary                                       | <input type="checkbox"/> <b>TT</b> トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input type="checkbox"/> <b>ID</b> インドネシア Indonesia                                    | <input type="checkbox"/> <b>UA</b> ウクライナ Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> <b>IL</b> イスラエル Israel  | <input type="checkbox"/> <b>UG</b> ウガンダ Uganda   |
| <input type="checkbox"/> <b>IN</b> インド India   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> 米国 United States of America                      |
| <input type="checkbox"/> <b>IS</b> アイスランド Iceland                                      | <input type="checkbox"/> <b>UZ</b> ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> 日本 Japan                                 | <input type="checkbox"/> <b>VN</b> ヴィエトナム Viet Nam   |
| <input type="checkbox"/> <b>KE</b> ケニア Kenya   | <input type="checkbox"/> <b>YU</b> ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> <b>KG</b> キルギス Kyrgyzstan                                     | <input type="checkbox"/> <b>ZW</b> ジンバブエ Zimbabwe  |
| <input type="checkbox"/> <b>KP</b> 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea           |  |
| <input type="checkbox"/> <b>KR</b> 韓国 Republic of Korea                                |  |
| <input type="checkbox"/> <b>KZ</b> カザフスタン Kazakhstan                                   |  |
| <input type="checkbox"/> <b>LC</b> セント・ルシア Saint Lucia                                 |  |
| <input type="checkbox"/> <b>LK</b> スリ・ランカ Sri Lanka                                    |  |

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)





## 第VI欄 優先権主張

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先 の 出 願		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 24. 04. 98	平成10年特許願 第131159号	日本国 JAPAN		
(2)				
(3)				

☒ 上記 ( ) の番号の先の出願 (ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る) のうち、次の ( ) の番号のものについては、出願書類の認証原本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁 (日本特許庁の長官) に対して請求している。 (1)

\*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない (規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

## 第VII欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択

先の調査結果の利用請求 : 当該調査の照会 (先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

ISA / J P

出願日 (日. 月. 年)

出願番号

国名 (又は広域官庁)

## 第VIII欄 照合欄 : 出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 .....	5 枚
明細書 (配列表を除く) .....	23 枚
請求の範囲 .....	2 枚
要約書 .....	1 枚
図面 .....	枚
明細書の配列表 .....	枚
合 計	31 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- |   |  |
|---|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙              | 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類 (上記第VI欄の ( ) の番号を記載する) |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面    | 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する)   |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> 別紙の記名押印された委任状        | 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面        |
| 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し                        | 8. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク) |
| 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) の説明書                  | 9. <input checked="" type="checkbox"/> その他 (書類名を詳細に記載する) |

優先権書類送付請求書

要約書とともに提示する図面:

本国際出願の使用言語名: 日本語

## 第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

室 田 力 雄



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日		2. 図面	
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)		<input type="checkbox"/> 受理された	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日		<input type="checkbox"/> 不足図面がある	
5. 出願人により特定された 国際調査機関	ISA / J P	6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月: 再版1999年1月)



# 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

室田 力雄

あて名

〒650-0024

兵庫県神戸市中央区海岸通6番地 建隆ビル  
II 5階 室田国際特許事務所

P C T

殿 (Notification of Filing date and No.)

## 国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）  
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP99/02205

RO105

発送日（日、月、年）

11. 05. 99

出願人又は代理人  
の書類記号

9904-PT1

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP99/02205

国際出願日（日、月、年）

23. 04. 99

優先日（日、月、年）

24. 04. 98

出願人（氏名又は名称）

国際試薬株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、11 日 05 月 99 年 に国際事務局に送付した。

### 注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

MUROTA, Rikio  
5F., Kenryu Building II  
6, Kaigan-dori, Chuo-ku  
Kobe-shi  
Hyogo 650-0024  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 28 May 1999 (28.05.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 9904-PT1	International application No. PCT/JP99/02205

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION et al (for all designated States except US)  
BABA, Toshiyuki et al (for US)

International filing date : 23 April 1999 (23.04.99)  
Priority date(s) claimed : 24 April 1998 (24.04.98)  
Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 17 May 1999 (17.05.99)  
List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : CN, JP, US

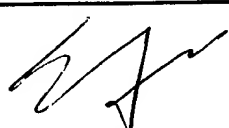
ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  Susumu Kubo 
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**

**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MUROTA, Rikio  
Sankyoseiko-Sukai Building, 8th  
floor  
101, Edomachi  
Chuo-ku  
Kobe-shi  
Hyogo 650-0033  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 24 June 1999 (24.06.99)	
Applicant's or agent's file reference 9904-PT1	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP99/02205	International filing date (day/month/year) 23 April 1999 (23.04.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 24 April 1998 (24.04.98)
Applicant  INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
24 April 1998 (24.04.98)	10/131159	JP	22 June 1999 (22.06.99)

<p style="text-align: center;"><b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold;">Juan Cruz</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
--	--





( Demand for International Preliminary Examination )  
特許協力条約に基づく国際出願

第 II 章

国際予備審査請求書

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、  
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

国際予備審査機関記入欄

国際予備審査機関の承認		請求書の受理の日	
第 I 欄 国際出願の表示		出願人又は代理人の書類記号 9904-PT1	
国際出願番号 PCT/JIP99/02205	国際出願日 (日. 月. 年) 23. 04. 99	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 24. 04. 98	
発明の名称 酵素の安定化方法及び酵素組成物			

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)		電話番号:	
国際試薬株式会社 International Reagents Corporation 〒651-0083 日本国兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目 1番30号 1-30, Hamabe-dori 2-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-0083 JAPAN		078-231-4151	
		ファクシミリ番号:	
		078-232-0548	
		加入電話番号:	
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)			
旭化成工業株式会社 Asahi Chemical Industry Co., Ltd. 〒530-0004 日本国大阪府大阪市北区堂島浜1丁目 2番6号 2-6, Dojimahama 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0004 JAPAN			
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)			
馬場利幸 BABA Toshiyuki 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2 国際試薬株式会社内 c/o International Reagents Corporation, 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-2241 JAPAN			
国籍 (国名): 日本国 JAPAN		住所 (国名): 日本国 JAPAN	
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が続葉に記載されている。			



## 第II欄の続き 出願人

この第II欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

田 畑 光 正 TABATA Hiromasa

〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2

国際試薬株式会社内

c/o International Reagents Corporation,

1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi,

Hyogo 651-2241 JAPAN

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

永 松 剛 NAGAMATSU Katashi

〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2

国際試薬株式会社内

c/o International Reagents Corporation,

1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi,

Hyogo 651-2241 JAPAN

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

渡 津 吉 史 WATAZU Yoshifumi

〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2

国際試薬株式会社内

c/o International Reagents Corporation,

1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi,

Hyogo 651-2241 JAPAN

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

青 木 亮 治 AOKI Ryoji

〒410-2321 日本国静岡県田方郡大仁町三福632番の1

旭化成工業株式会社内

c/o Asahi Chemical Industry Co., Ltd,

632-1, Mifuku, Ohitocho, Tagata-gun, Shizuoka 410-2321 JAPAN

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

☐ その他の出願人が他の続票に記載されている。



## 第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

9183 弁理士 室田 力雄 MUROTA Rikio

〒650-0033 日本国兵庫県神戸市中央区江戸町101番地

三共生興スカイビル8階

8F., Sankyoseiko-Sukai Bldg., 101, Edomachi, Chuo-ku, Kobe-shi,

Hyogo 650-0033 JAPAN

電話番号:

078-392-3470

ファクシミリ番号:

078-392-2508

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

## 第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述: \*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☒ 明細書に関して

☒ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☒ 請求の範囲に関して

☒ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正(添付した説明書も含む)を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過まで延期されることを希望する(ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く(規則69.1(d))。この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。)

\* 記入がない場合は、1) 補正がないか又は国際予備審査機関が補正(原本又は写し)を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2) 国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正(原本又は写し)を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日本語 であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

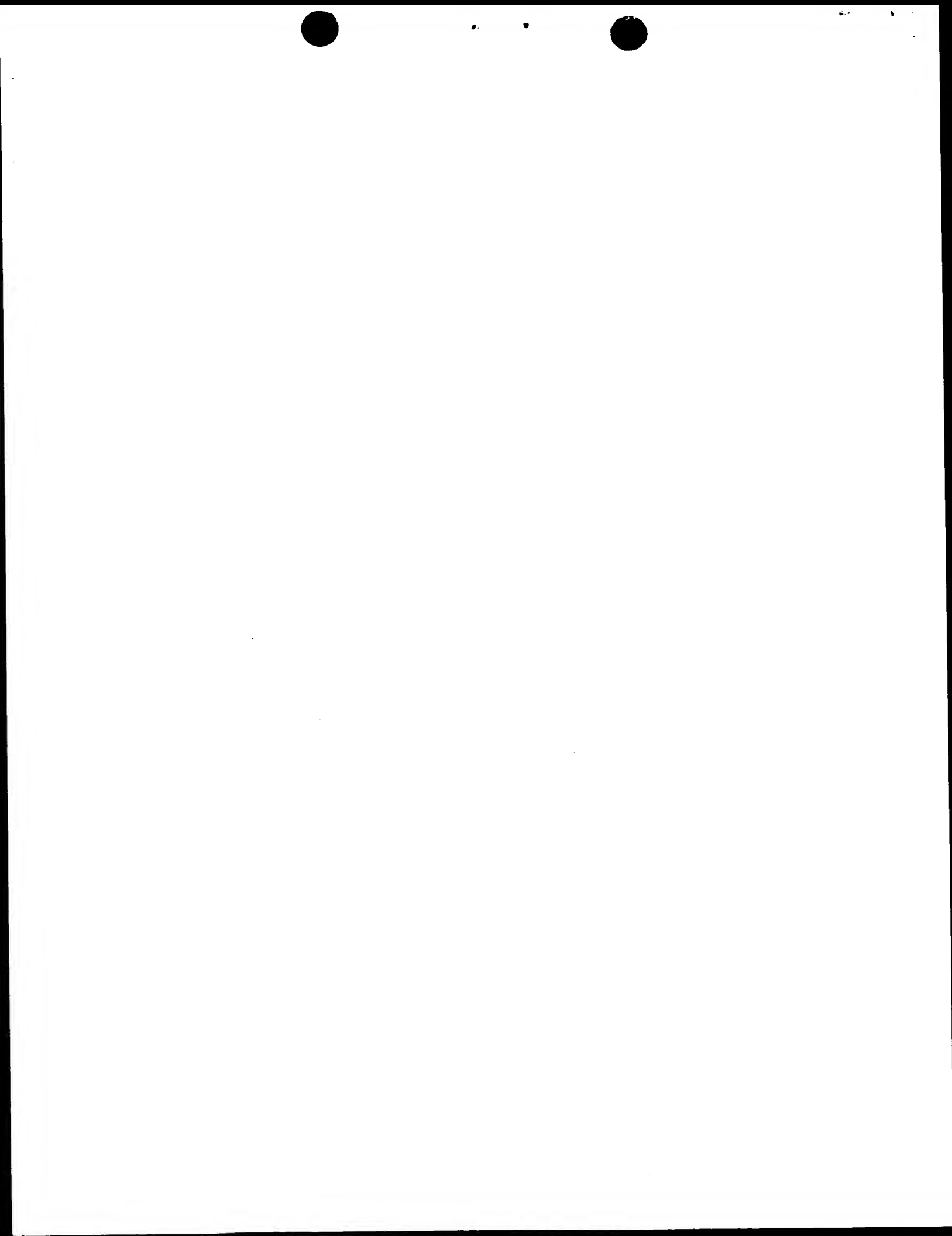
☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

## 第V欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国(即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国)を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。:



## 第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

## 国際予備審査機関記入欄

受 領 未 受 領

1. 国際出願の翻訳文・・・・・・・・・・・・・・・・・・

枚

☐☐

2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書・・・・・・・・

枚

☐☐

3. 特許協力条約第12条の規定に基づく修正書・・・・・・・・

枚

☐☐

4. 特許協力条約第12条の規定に基づく説明書・・・・・・・・

枚

☐☐

5. 書簡・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

枚

☐☐

6. その他（書類名を具体的に記載する）：

枚

☐☐

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙3. ☐ 包括委任状の写し☒ 納付した手数料に相当する特許印紙を  
貼付した書面4. ☐ 記名押印（署名）に関する説明書☒ 国際事務局の口座への振込を証明する書面5. ☐ スクレイプシフト又はアイスクレイプ配列表2. ☐ 別個の記名押印された委任状6. ☐ その他（書類名を具体的に記載する）：

## 第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

室 田 力 雄



## 国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

## 国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日：





( Notification of change of Person )  
 名義変更届

特許庁長官 殿

1. 国際出願の表示 PCT/J P 99/02205

2. 出願人

名 称 国際試薬株式会社 International Reagents Corporation  
 あて名 〒651-0083 日本国兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号  
 1-30, Hamabe-dori 2-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-0083  
 JAPAN  
 国 籍 日本国 Japan  
 住 所 日本国 Japan

3. 届出の内容 新名義人

事件との関係 指定国ヨーロッパ、中国、日本における出願人 Applicant (EP, CN, JP)  
 名 称 国際試薬株式会社 International Reagents Corporation  
 あて名 〒651-0083 日本国兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号  
 1-30, Hamabe-dori 2-chome, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-0083  
 JAPAN  
 国 籍 日本国 Japan  
 住 所 日本国 Japan

事件との関係 指定国日本における出願人 Applicant (JP only)  
 名 称 旭化成工業株式会社 Asahi Chemical Industry Co., Ltd.  
 あて名 〒530-0004 日本国大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号  
 2-6, Dojimahama 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0004  
 JAPAN  
 国 籍 日本国 Japan  
 住 所 日本国 Japan

事件との関係 Applicant (US) and Inventor  
 指定国米国における出願人及びすべての指定国における発明者  
 氏 名 馬 場 利 幸 BABA Toshiyuki  
 あて名 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2  
 国際試薬株式会社内  
 c/o International Reagents Corporation,  
 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-2241  
 JAPAN  
 国 籍 日本国 Japan  
 住 所 日本国 Japan



氏 名 田 畑 光 正 TABATA Hiromasa  
 あて名 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2  
 国際試薬株式会社内  
 c/o International Reagents Corporation,  
 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-2241  
 JAPAN

国 籍 日本国 Japan  
 住 所 日本国 Japan

氏 名 永 松 剛 NAGAMATSU Katashi  
 あて名 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2  
 国際試薬株式会社内  
 c/o International Reagents Corporation,  
 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-2241  
 JAPAN

国 籍 日本国 Japan  
 住 所 日本国 Japan

氏 名 渡 津 吉 史 WATAZU Yoshifumi  
 あて名 〒651-2241 日本国兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2  
 国際試薬株式会社内  
 c/o International Reagents Corporation,  
 1-2, Murotani 1-chome, Nishi-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-2241  
 JAPAN

国 籍 日本国 Japan  
 住 所 日本国 Japan

事件との関係 発明者のみ *Inventor only*

氏 名 青 木 亮 治 AOKI Ryoji  
 あて名 〒410-2321 日本国静岡県田方郡大仁町三福632番の1  
 旭化成工業株式会社内  
 c/o Asahi Chemical Industry Co., Ltd,  
 632-1, Mifuku, Ohitocho, Tagata-gun, Shizuoka 410-2321 JAPAN

国 籍 日本国 Japan  
 住 所 日本国 Japan



4. 代理人  
氏 名

(9183) 弁理士 室 田 力 雄  
MUROTA Rikio



あて名

〒650-0033 日本国兵庫県神戸市中央区江戸町101番地  
三共生興スカイビル8階  
8F., Sankyoseiko-Sukai Bldg., 101, Edomachi, Chuo-ku, Kobe-shi,  
Hyogo 650-0033 JAPAN



## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 9904-PT1	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/02205	International filing date (day/month/year) 23 April 1999 (23.04.99)	Priority date (day/month/year) 24 April 1998 (24.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/96		
Applicant INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 July 1999 (16.07.99)	Date of completion of this report 06 March 2000 (06.03.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02205

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02205

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The inventions relating to Claims 1 through 9 are not described in any of the documents cited in the ISR nor in any of the documents considered relevant to the inventions, nor are they obvious to a party skilled in the art.



P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 17 MAR 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 9904-PT1	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/02205	国際出願日 (日.月.年) 23.04.99	優先日 (日.月.年) 24.04.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 9/96		
出願人 (氏名又は名称) 国際試薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 16.07.99	国際予備審査報告を作成した日 06.03.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 印	4 N 9152
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)





V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-9に記載されている発明は、いずれも国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。



発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

室田 力雄

殿

あて名

〒 650-0033

兵庫県神戸市中央区江戸町101番地

三共生興スカイビル8階

(International Preliminary Examination Report)  
PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)

〔PCT規則71.1〕

発送日  
(日.月.年)

14.03.00

出願人又は代理人  
の書類記号

9904-PT1

重要な通知

国際出願番号

PCT/J P 99/02205

国際出願日

(日.月.年) 23.04.99

優先日

(日.月.年) 24.04.98

出願人（氏名又は名称）

国際試薬株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 N 9 1 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



P C T


## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[P C T 3 6 条及びP C T 規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 9904-PT1	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式P C T / I P E A / 4 1 6)を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 2 2 0 5	国際出願日 (日.月.年) 23.04.99	優先日 (日.月.年) 24.04.98
国際特許分類 (I P C) Int. Cl <sup>7</sup> C12N 9/96		
出願人 (氏名又は名称) 国際試薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (P C T 3 6 条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (P C T 規則70.16及びP C T 実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> P C T 3 5 条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 16.07.99	国際予備審査報告を作成した日 06.03.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 	4 N 9 1 5 2
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-9

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-9

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-9

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-9に記載されている発明は、いずれも国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。



発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

出願人代理人

室田 力雄

殿

あて名

〒 650-0033

兵庫県神戸市中央区江戸町101番地  
三共生興スカイビル8階PCT  
(International Search Report)  
国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)

[PCT規則44.1]

発送日

(日.月.年)

13.07.99

出願人又は代理人  
の書類記号

9904-PT1

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/J P 99/02205

国際出願日

(日.月.年)

23.04.99

出願人 (氏名又は名称)

国際試薬株式会社

- 1.
- ☒
- 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22)740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

- 2.
- ☐
- 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

- 3.
- ☐
- 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続: 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 N

9 1 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
[ P C T 1 8 条、P C T 規則43、44 ]

出願人又は代理人 書類記号 9904-PT1	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0 ) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 2 2 0 5	国際出願日 (日.月.年) 23.04.99	優先日 (日.月.年) 24.04.98
出願人 (氏名又は名称) 国際試薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 ( P C T 1 8 条 ) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 ( P C T 規則38.2(b) ) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 9/96

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 9/96

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 57-122795, A (イバン・エンドレ・モドロビッチ) 30. 7月. 1982 (30. 07. 82) 特許請求の範囲第 2 1, 2 2 項 & EP, 49475, A & US, 4652524, A	1-9
A	JP, 55-141194, A (ベックマン・インストルメンツ・インコーポレー テッド) 4. 11月. 1980 (04. 11. 80) 特許請求の範囲第 1, 7 項 & EP, 16573, A & US, 4325832, A	1-9
A	JP, 8-187095, A (東洋紡績株式会社) 23. 7月. 1996 (23. 07. 96) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 07. 99

国際調査報告の発送日

13.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3488





C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 60-224499, A(東洋紡績株式会社) 8. 11月. 1985 (08. 11. 85) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9
A	JP, 51-26284, A(天野製薬株式会社) 4. 3月. 1976 (04. 03. 76) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9



## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 9904-PT1	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/02205	国際出願日 (日.月.年) 23.04.99	優先日 (日.月.年) 24.04.98
出願人(氏名又は名称) 国際試薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

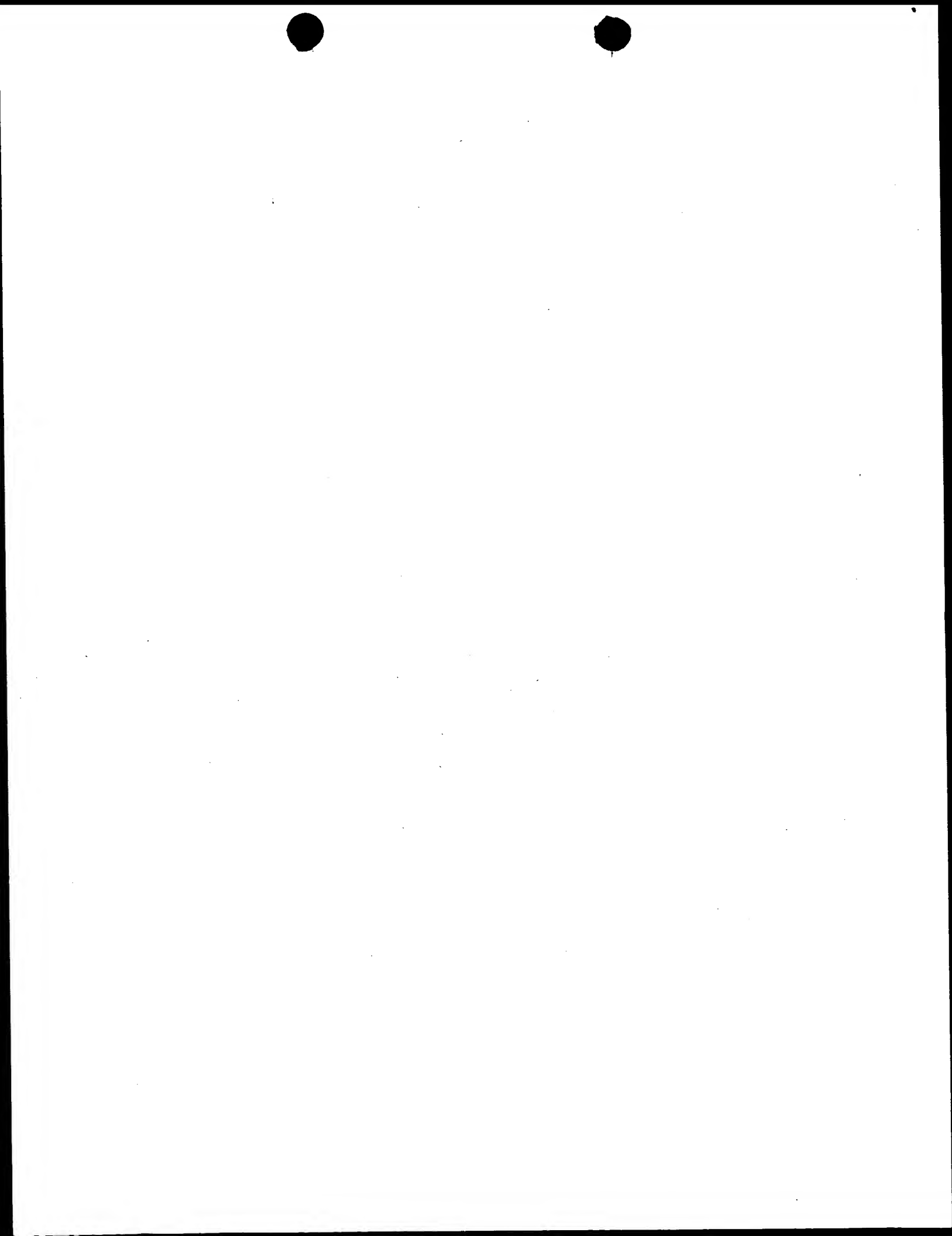
6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

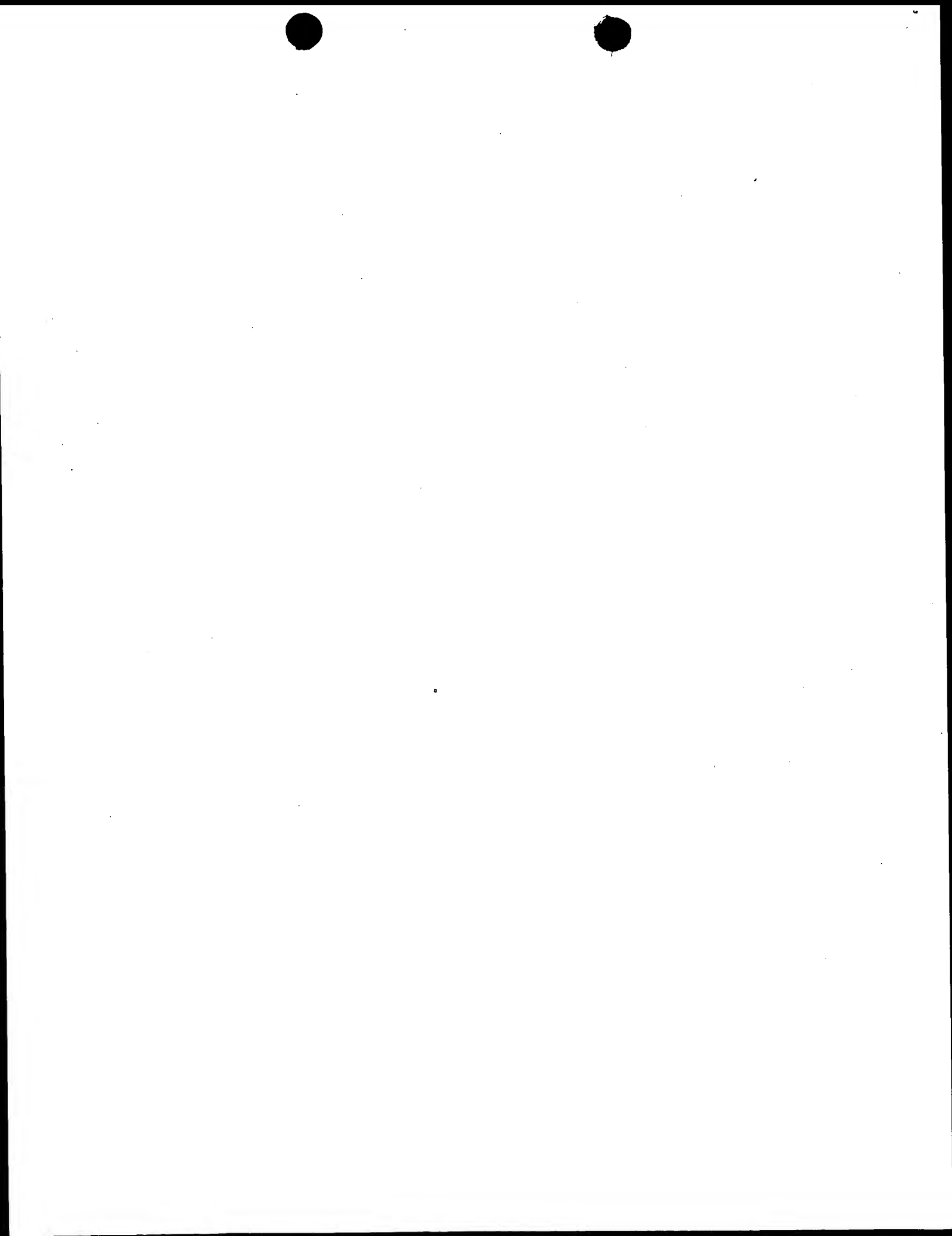
☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

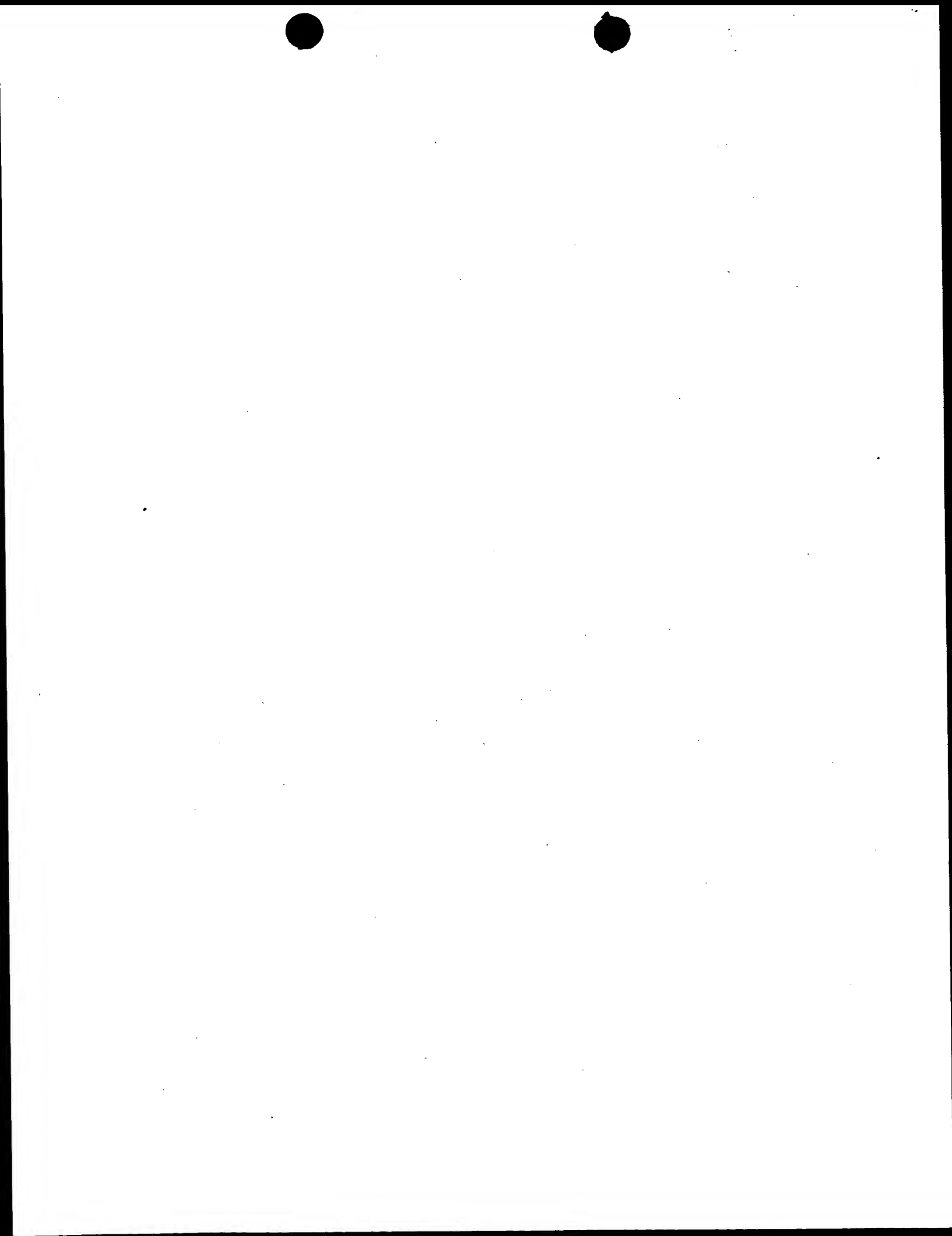


A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>8</sup> C12N 9/96		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>8</sup> C12N 9/96		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 57-122795, A (イバン・エンドレ・モドロビッチ) 30.7月.1982 (30.07.82) 特許請求の範囲第21, 22項 & EP, 49475, A & US, 4652524, A	1-9
A	JP, 55-141194, A (ベックマン・インストルメンツ・インコーポレー テッド) 4.11月.1980 (04.11.80) 特許請求の範囲第1, 7項 & EP, 16573, A & US, 4325832, A	1-9
A	JP, 8-187095, A (東洋紡績株式会社) 23.7月.1996 (23.07.96) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	06.07.99	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり
		4 N 9 1 5 2 電話番号 03-3581-1101 内線 3488



## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 60-224499, A(東洋紡績株式会社) 8. 11月. 1985 (08. 11. 85) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9
A	JP, 51-26284, A(天野製薬株式会社) 4. 3月. 1976 (04. 03. 76) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-9







<b>(51) 国際特許分類6</b> C12N 9/96	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/55850</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年11月4日 (04.11.99)		
<table border="0" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top;"><b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/02205  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年4月23日 (23.04.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/131159 1998年4月24日 (24.04.98)  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 国際試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION)[JP/JP] 〒651-0083 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号 Hyogo, (JP) 旭化成工業株式会社 (ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.)(JP/JP) 〒530-0004 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP)  <b>(72) 発明者 ; および</b>  <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 馬場利幸(BABA, Toshiyuki)[JP/JP] 田畑光正(TABATA, Hiromasa)[JP/JP] 永松 剛(NAGAMATSU, Katashi)[JP/JP] 渡津吉史(WATAZU, Yoshifumi)[JP/JP] 〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2 国際試薬株式会社内 Hyogo, (JP)</td><td style="width: 50%; vertical-align: top;"><b>(74) 代理人</b> 弁理士 室田力雄(MUROYA, Rikio) 〒650-0033 兵庫県神戸市中央区江戸町101番地 三共生興スカイビル8階 Hyogo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書</td></tr></table>			<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/02205  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年4月23日 (23.04.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/131159 1998年4月24日 (24.04.98)  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 国際試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION)[JP/JP] 〒651-0083 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号 Hyogo, (JP) 旭化成工業株式会社 (ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.)(JP/JP) 〒530-0004 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP)  <b>(72) 発明者 ; および</b>  <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 馬場利幸(BABA, Toshiyuki)[JP/JP] 田畑光正(TABATA, Hiromasa)[JP/JP] 永松 剛(NAGAMATSU, Katashi)[JP/JP] 渡津吉史(WATAZU, Yoshifumi)[JP/JP] 〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2 国際試薬株式会社内 Hyogo, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 弁理士 室田力雄(MUROYA, Rikio) 〒650-0033 兵庫県神戸市中央区江戸町101番地 三共生興スカイビル8階 Hyogo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/02205  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年4月23日 (23.04.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/131159 1998年4月24日 (24.04.98)  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 国際試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION)[JP/JP] 〒651-0083 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号 Hyogo, (JP) 旭化成工業株式会社 (ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.)(JP/JP) 〒530-0004 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP)  <b>(72) 発明者 ; および</b>  <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 馬場利幸(BABA, Toshiyuki)[JP/JP] 田畑光正(TABATA, Hiromasa)[JP/JP] 永松 剛(NAGAMATSU, Katashi)[JP/JP] 渡津吉史(WATAZU, Yoshifumi)[JP/JP] 〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2 国際試薬株式会社内 Hyogo, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 弁理士 室田力雄(MUROYA, Rikio) 〒650-0033 兵庫県神戸市中央区江戸町101番地 三共生興スカイビル8階 Hyogo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書			
<b>(54) Title:</b> <u>METHOD FOR STABILIZING ENZYMES AND ENZYME COMPOSITIONS</u>  <b>(54) 発明の名称</b> 酵素の安定化方法及び酵素組成物  <b>(57) Abstract</b> A method aiming at accurately and stably effecting medical examinations with the use of aspartate aminotransferase or alanine aminotransferase by stabilizing the aspartate aminotransferase or alanine aminotransferase in media. Valine and proline are added to the media (serum, buffer, etc.) as a component for stabilizing aspartate aminotransferase or alanine aminotransferase contained therein.				





① 日本国特許庁

# 公開特許公報

特 許 願 (2) 後記号なし  
昭和49年 8月 30日

特許庁長官 齋 藤 英 雄 殿

1. 発明の名称 アミノ酸の安定化法

2. 発明者

住所 愛知県犬山市大字上野字米野1177番地  
氏名 服部 靖 夫  
(ほか2名)

3. 特許出願人

住所 愛知県名古屋市中区錦一丁目1番2号  
名称 天野製薬株式会社  
代表者 天野 源 博

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区芝西久保横川町1番地  
邦楽ビル503  
氏名 弁護士 戸田 親 男

① 特開昭 51-26284

③ 公開日 昭51. (1976) 3. 4

② 特願昭 49-PP01P

② 出願日 昭49. (1974) 8. 20

審査請求 未請求 (全3頁)

庁内整理番号 7235 4P

7043 4P

7235 4P

7235 4P

⑤ 日本分類

26(2)C03

26(2)C1

26(2)C2

26(2)C3

⑤ Int.Cl<sup>2</sup>

C07G 7/02

## 明 細 書

1. 発明の名称

酵素の安定化法

2. 特許請求の範囲

セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼまたはリパーゼの酵素粗液、精製液、もしくは粉末化物にアミノ酸またはペプチドの1種又は2種以上を存在せしめることを特徴とする酵素の安定化法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は安定な酵素の製造方法に関するもので、更に詳細には、本発明は、酵素の溶液または粉末状物に於てアミノ酸又はペプチドを共存せしめて酵素を安定化する方法に関するものである。

一般に、酵素は極めて不安定で失活し易く、そのために各種酵素剤を製造するに際しては、すみやかに処理して酵素を母液から分離して粉末化することが必要である。この粉末化の一手間として溶剤等による処理が行なわれているが、この処理の間にも失活が起り酵素の収量の低下をきたすことになる。又、粉末化しても酵素は徐々に失活し

ていく。

本発明者らは、このような酵素の失活の問題を検討し、出来るだけ失活を防ぐ方法について研究したところ粗酵素液の状態から各種アミノ酸またはペプチドを添加しておくことと精製・粉末化に際して失活を防止でき、また粉末化酵素にもそのままアミノ酸またはペプチドを存在させておくと、失活の速度を著しく遅らせることができることを知り、また、この現象はアミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼにおいてきわめてすぐれていることを知つたのである。~~また、この現象はアミラーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼにおいてきわめてすぐれていることを知つたのである。~~

本発明は、この知見により完成されたもので、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼまたはリパーゼの酵素粗液又は精製液もしくは粉末化物にアミノ酸またはペプチドの一種又は2種以上を存在させることにより酵素を安定化する方法である。

1. 発明

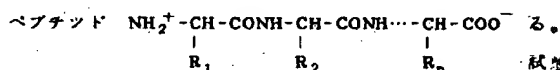
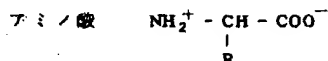
2. 発明

3. 発明



本発明における酵素へのアミノ酸、ペプチドの添加は、酵素抽出液、粗酵素液のときから添加しておくのが最も効果的であり、これによつて精製工程中における酵素の失活をほとんど防止できるようになる。

本発明に使用するアミノ酸又はペプチドとは、水に可溶性であつて、使用する有機溶剤に実質的に不溶性である両性電解質で一般に次式で示される。



但し R, R<sub>1</sub> … R<sub>n</sub> はアルキル基を示す。

アミノ酸の例としてはアルギニン、ヒスチジン、リジン、グリシン、グルタミン、グルタミン酸ソーダ、アスパラギン酸等でありペプチドの例としてはグルタチオン、グリシルアラニン、カルノシン等である。

アミノ酸は、酵素抽出液、精製液、又は濃縮液、

脱塩濃縮液等の溶液に対しては0.5%～1.5% (重量/容量) 溶解し、また、粉末化酵素には1～30%になるように溶液状で混合しておいて、これに有機溶剤を加え、沈澱を生成させてアミノ酸又はペプチドを存在させることになる。

このようにアミノ酸またはペプチドをセルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼと一緒に存在させておけば、精製中の溶液中でも失活を防止でき、粉末化物であれば、失活を著しく遅延させることができるものである。

次に試験例によつて本発明の効果を明らかにす

#### 試験例 1

アスペルギルス・ニガー IAM 3008 の穀培地培養物を水で抽出し酸性プロテアーゼ抽出液を得、これを常法に従つて、冷エタノールで沈澱分離洗滌して製造した製品と、冷エタノールで沈澱すに先立つて浸出液の1% (重量/容量) のグリシンまたはグルタミン酸ソーダを添加して製造した本発明の製品の安定度を、粉末及び溶液によつて

比較した。その結果は、次の第1表及び第2表に示されるが、粉末及び溶液のいずれにおいてもグリシン、グルタミン酸ソーダを添加した場合は酵素活性の残存率が高められているのが明らかである。

第 1 表

粉末酸性プロテアーゼの安定性試験

酵 素	温 度	酵素活性残存率%			
		0 時間	5 時間	15 時間	24 時間
無 添 加	105℃	100	55.6	36.6	19.4
グリシン添加	105℃	100	76.3	63.8	51.9
グルタミン酸ソーダ添加	105℃	100	71.9	57.5	46.9

第 2 表

溶液酸性プロテアーゼの安定性試験

酵 素	温 度	酵素活性残存率%			
		0 分	30 分	60 分	120 分
無 添 加	50℃	100	40.9	20.4	11.3
グリシン添加	50℃	100	98.1	97.7	94.4
グルタミン酸ソーダ添加	50℃	100	100	96.4	89.7

1% 酵素溶液 (pH 2.6) を 50℃ で各時間処理し、残存活性を測定

#### 試験例 2

アスペルギルス・イヌイ IAM 2268 の穀培地培養物を水で抽出してリパーゼ抽出液を得、この抽出液に1% (重量/容量) のグリシンまたはグルタミン酸ソーダを加え、酵素活性の残存率をみた。その結果は次の第3表に示されるが、グリシン、グルタミン酸ソーダを添加した場合は酵素活性の残存率が高められているのが明らかである。

第 3 表

リパーゼの安定性試験

酵 素	温 度	酵素活性残存率%			
		0 分	30 分	60 分	120 分
無 添 加	60℃	100	87.9	80.7	68.6
グリシン添加	60℃	100	99.4	97.6	94.6
グルタミン酸ソーダ添加	60℃	100	95.0	93.0	89.0

1% 酵素溶液 (pH 6.0) を 60℃ で各時間処理し、残存活性を測定

次に本発明の実施例を示す。



## 実施例 1

グルタミンラーゼ生産性のリゾプス・デレー  
IAM 6059 菌培地培養物より得た水性抽出液の  
脱塩濃縮液 200 ml にグルタミン酸ソーダ 4 g を添  
加溶解し 5℃ に冷却し、攪拌しながら -15℃ に  
冷却したエタノール 500 ml を徐々に加え約 5 分後  
に攪拌を止め、傾斜法で沈澱を築め、冷エタノ  
ールで 2 回洗滌後、減圧下に乾燥して、均一なグル  
タミンラーゼ粉末 26.8 g を得た。この活性収率は  
95.2 % であつた。この製品は 105℃ で 4 時間加  
熱し安定性試験を行つた所酵素活性残存率は 41  
% であつた。これに対し従来法により製造した酵  
素粉末の酵素活性残存率は 27 % であつた。

## 実施例 2

アルカリプロテアーゼ生産性のアスペルギルス・  
ヤボニカス IAM 2083 の菌培地培養物の水性抽出  
液の脱塩濃縮液 200 ml にアルギニン 4 g を添加溶  
解し、実施例 1 と同一の方法でプロテアーゼ粉末  
19.3 g を得た。この時の活性収率は 94.1 % で  
あつた。

5℃ に冷却し攪拌しながら -15℃ に冷却したエ  
タノール 800 ml を添加し、約 5 分後に攪拌を止め、  
傾斜法で沈澱を築め冷却したエタノールで 2 回洗  
浄に減圧下に乾燥して、均一な粒性を持ち、安定  
なセルラーゼ粉末 28.7 g を得た。活性収率は 93.9  
% であつた。

セルラーゼの安定性試験

酵 素	温 度	酵素活性残存率 %				
		0 分	10 分	20 分	30 分	60 分
無 添 加	60℃	100	75.0	59.2	47.2	33.0
グリシン添加	60℃	100	86.2	70.5	59.0	42.4

1% 酵素溶液 (pH 4.5) を 60℃ で各時間処理  
し残存活性を測定

特許出願人 天野製薬株式会社  
代 理 人 戸 田 親 男

該酵素を 1% 水溶液とし 50℃ で 1 時間加熱し、  
安定性試験を行つた所酵素活性残存率は 44.4 %  
であつた。これに対し従来法により製造した酵素  
の活性残存率は 27.7 % であつた。

## 実施例 3

リパーゼ生産性のアスペルギルス・イヌイ IAM  
2268 の菌培地培養物の水性抽出液 500 ml にグリ  
シン 7.5 g を添加溶解し、攪拌しながら -15℃  
に冷却したエタノール 1500 ml を添加し、実施例 1  
に準じて製造し、リパーゼ粉末 10.4 g を得た。こ  
のときの活性収率は 91.5 % であつた。該製品の 1  
% 酵素液を pH 6.0 とし、60℃ で 120 分間処理し  
た結果酵素活性残存率は 94.6 % であり従来法によ  
るものは 68.6 % であつた。又、前記グリシンをグ  
ルタミン酸ソーダに置き換えて製造した場合は酵素活  
性残存率 89.0 % であつた。

## 実施例 5

セルラーゼを生産するアスペルギルス・アフロ  
リ IAM 2300 を菌培地に培養して得た水性抽出液  
の脱塩濃縮液 200 ml にグリシン 8 g を添加溶解し、

## 5. 添付書類の目録

- |             |     |
|-------------|-----|
| (1) 明 細 書   | 1 通 |
| (2) 委 任 状   | 1 通 |
| (3) 願 書 副 本 | 1 通 |

## 6. 前記以外の発明者

住 所 エシカスガイ エシヘル オキムラ クラマエ  
愛知県西春日井郡西春日町大字沖村字蔵前

28 番地の 15

氏 名 マツ ダ カズ ヒロ  
松 田 和 広

住 所 ハダリ キソガワ クロダ ナカノダ  
愛知県東春日井郡木曽川町黒田字中野黒

19-5 番地

氏 名 サ サ キ イク ヘル  
佐 々 木 征 治





## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-122795

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 9/96

識別記号

庁内整理番号  
7421-4B

⑬ 公開 昭和57年(1982) 7月30日

発明の数 7  
審査請求 未請求

(全 15 頁)

## ⑭ 可溶性安定化酵素

⑯ 特 願 昭56-156335

⑰ 出 願 昭56(1981)10月2日

優先権主張 ⑱ 1980年10月2日 ⑲ 米国(US)  
⑳ 193116㉑ 発 明 者 イバン・エンドレ・モドロビツ  
チ  
米国カリフォルニア州カマリロ  
・メサ・ドライブ1043㉒ 発 明 者 ワンダ・アン・ゴーシラン  
米国カリフォルニア州カマリロ・グランジャー・ストリート19  
22㉓ 発 明 者 ボール・エフ・ウエグフアート  
・ジュニア  
米国カリフォルニア州カマリロ  
・ノース・グレンブルック・ア  
ベニュー1829㉔ 出 願 人 イバン・エンドレ・モドロビツ  
チ  
米国93010カリフォルニア州カ  
マリロ・メサ・ドライブ1043

㉕ 代 理 人 弁理士 倉内基弘 外1名

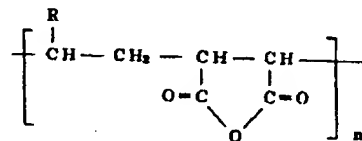
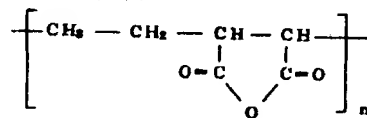
## 明 細 書

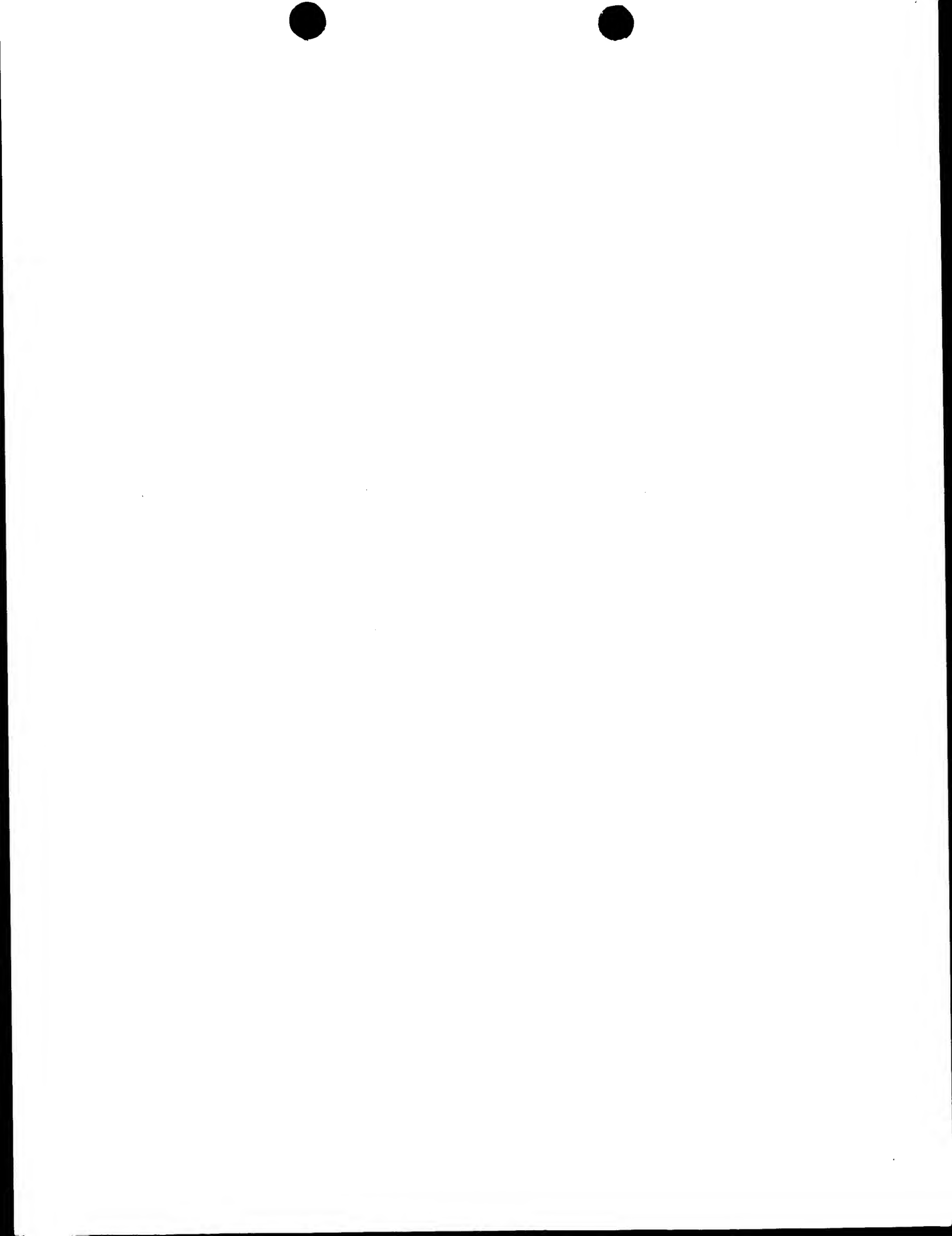
## 1 発明の名称 可溶性安定化酵素

## 2 特許請求の範囲

(1)(a) 酵素を、この酵素上の側基と共有結合しう  
る側基を有する重合体と液体媒体中で反応さ  
せ、(b) 酵素及び重合体を酵素の活性に作用を及ぼ  
さない少なくとも1種の組成物と混合し、こ  
の組成物は前記酵素に対する基質、生成物、  
活性化剤及び(又は)抑制剤であることを特徴とする可溶性かつ安定な酵素の製造方  
法。(2) 液体媒体がジメチルスルホキシド、アセトン、  
ジメチルホルムアミド及びピリジンよりなる群か  
ら選択される有機溶剤の水溶液からなる特許請求  
の範囲第1項記載の方法。(3) 水溶液が、トリス(ヒドロキシメチル)アミ  
ノメタン、イミダゾール、トリエタノールアミン及び(又は)磷酸緩衝剤であつて約5〜約10の  
pHを与えるのに足る量で存在する緩衝剤からな  
る特許請求の範囲第2項記載の方法。(4) 蛋白質様物質を存在させる特許請求の範囲第  
1項乃至第3項のいずれかに記載の方法。(5) 蛋白質様物質がアルブミン又はゼラチンであ  
る特許請求の範囲第4項記載の方法。(6) 重合体が無水物側基を有する特許請求の範囲  
第1項乃至第5項のいずれかに記載の方法。

(7) 重合体が式

(式中、Rはアルキル、アルケニル、アルキニ  
ル、シクロアルキル、アリール、アルカニール、  
アラルキル又は



であり、 $\alpha$ は整数である)

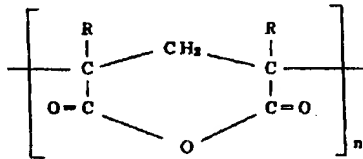
の構造単位を有する特許請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の方法。

(8) 重合体がエチレンと無水マレイン酸との共重合体である特許請求の範囲第1項乃至第4項のいずれかに記載の方法。

(9) 重合体がポリアクリル酸からなる特許請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載の方法。

(10) 重合体がポリメタクリル酸からなる特許請求の範囲第9項記載の方法。

(11) 重合体が式

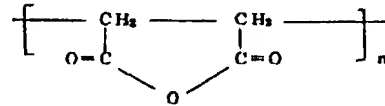


〔式中、 $n$ は整数であり、 $R$ は水素又はメチルから選択される基である〕

の少なくとも幾つかの構造単位を有する

特許請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載の方法。

(12) 重合体が式



〔式中、 $\alpha$ は整数である〕

の少なくとも幾つかの構造単位を有する

特許請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載の方法。

(13) 酵素がオキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドラーゼ、リアーゼ、リガーゼ、イソメラーゼ、デヒドロゲナーゼ、トランスアミナーゼ又はペプチダーゼである特許請求の範囲第1項乃至第12項のいずれかに記載の方法。

(14) 酵素が、

1. リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)、
2. クレアチンキナーゼ(CK, CPK)、
3. アリカリホスファターゼ(AP, ALP, ALK-Phos)、
4. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASP, OT, GOT, SGOT)、

5. アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT, PT, GPT, SGPT)、

6.  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ( $\gamma$ GT,  $\gamma$ GTP)、

7.  $\alpha$ -アミラーゼ、

8.  $\beta$ -アミラーゼ、

9. 乳酸デヒドロゲナーゼ(LD, LDH, ラクテラクトデヒドロゲナーゼ)、

10. グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)、

11. ヘキソキナーゼ(HK)、

12. グルコースデヒドロゲナーゼ、

13. グルコースオキシダーゼ、

14. ペルオキシダーゼ(HRP, HPO, PO)、

15. グリセリンデヒドロゲナーゼ、

16. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、

17. コレステロールオキシダーゼ、

18. コレステロールエステラーゼ、

19. リパーゼ、

20. ウリカーゼ、

21. ウレアーゼ、又は

22. グリセリンキナーゼ

である特許請求の範囲第1項乃至第12項のいずれかに記載の方法。

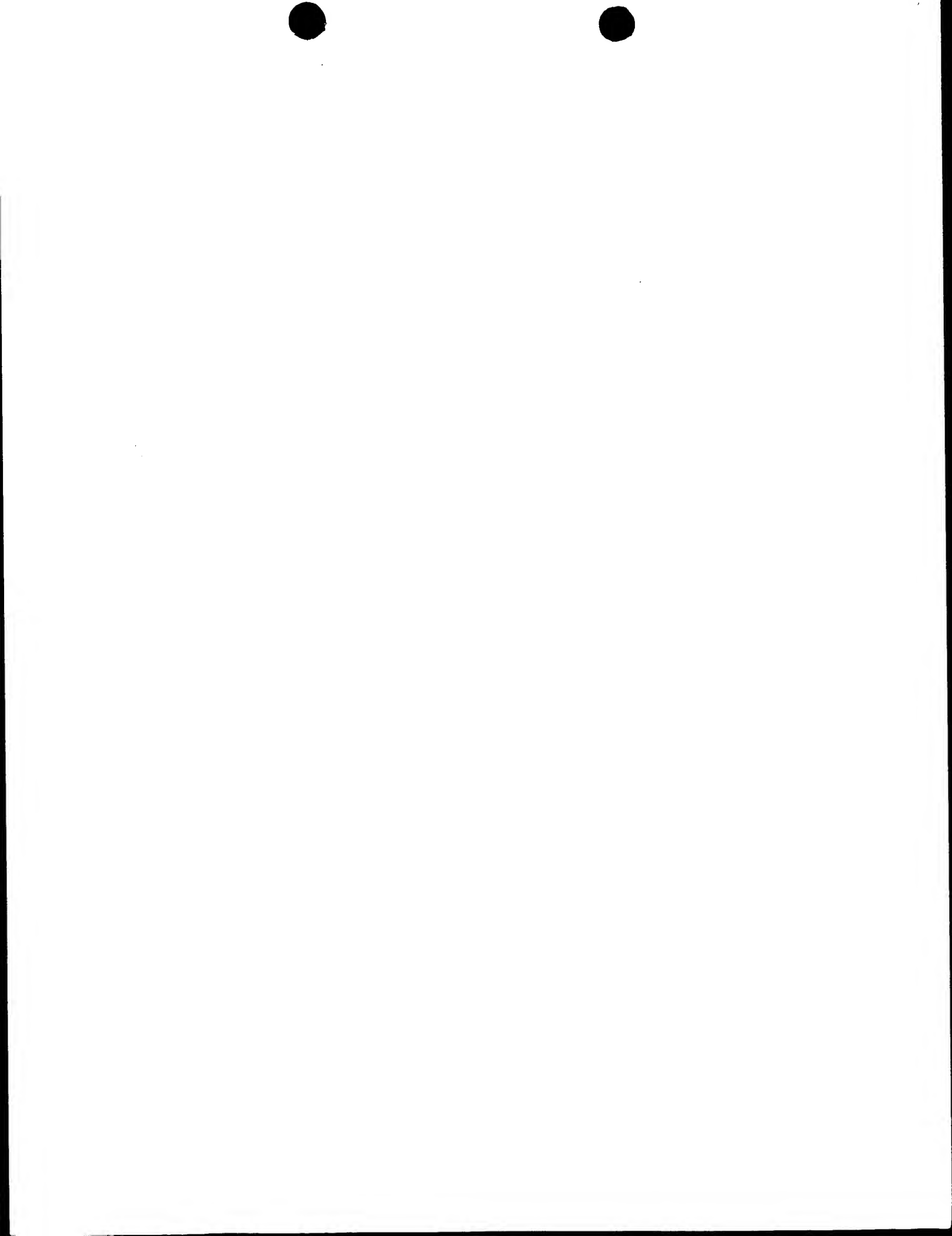
(15) (a) 約0.225重量%までのゼラチンと約0.1重量%までの $Na_2N_3$ と約500mg/dlまでのNADHと約500mg/dlまでのNADとを約1.1容量%のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを含む水中で混合することにより第1溶液を生成させ、

(b) エチレン無水マレイン酸をジメチルスルホキシド1ml当たり約10mgのエチレン無水マレイン酸の濃度で溶解して第2溶液を生成させ、

(c) 第1溶液と第2溶液とを混合して第3溶液を生成させ、

(d) 50容量%のグリセリンと50容量%の水とからなる溶剤中に溶解されたMDHの第4溶液を第3溶液に加えて、可溶化された安定酵素溶液を生成させる

ことを特徴とする可溶性安定化酵素溶液の製造方



法。

(16) M D H の第 4 溶液を、第 2 溶液と第 1 溶液との混合前に第 1 溶液に加えて混合する特許請求の範囲第 15 項記載の方法。

(17) 約 7.8 の pH を有するトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンの緩衝剤水溶液に溶解させた 600 mM の L - A B P と 0.5 重量 % のゼラチンとからなる第 5 溶液を加える工程をさらに含む特許請求の範囲第 15 項又は第 16 項記載の方法。

(18) (a) 約 0.225 重量 % までのゼラチンと 0.1 重量 % の  $\text{NaNO}_2$  と少なくとも約 5 重量 % のアルブミンと少なくとも約 1 重量 % のデキストランと少なくとも約 1 重量 % の A D P と少なくとも約 0.1 重量 % のメルカプトエタノールとを約 1.1 容積 % のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンからなる水溶液中に溶解してなる第 1 溶液を生成させ、

(b) エチレン無水マレイン酸の重合体をジメチルスルホキシド中に約 10 mg/ml の濃度で溶解してなる第 2 溶液を生成させ、

7

(20) 銅酸ピリドキサルを第 1 溶液に加える特許請求の範囲第 19 項記載の方法。

(21) (a) 約 0.225 重量 % までのゼラチンと 1 グラム % の L - アラニンと 1 重量 % の  $\alpha$  - ケトグルタル酸塩と 5 重量 % のアルブミンとを 1.1 容積 % のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンからなる緩衝水溶液中に溶解して第 1 溶液を生成させ、

(b) エチレン無水マレイン酸の重合体をジメチルスルホキシド中に 10 mg/ml の濃度で溶解して第 2 溶液を生成させ、

(c) 第 1 溶液と第 2 溶液とを混合して第 3 溶液を生成させ、かつ

(d) A B T 及び B O O T から選択される酵素を第 3 溶液に加えて安定化された可溶性酵素の溶液を生成させる

ことを特徴とする安定化可溶性酵素溶液の製造方法。

(22) (a) 約 0.225 重量 % までのゼラチンと 1 グラム % の L - アラニンと 1 重量 % の  $\alpha$  - ケトグル

8

(c) 第 1 溶液と第 2 溶液とを混合し、かつ

(d) 酵素クレアチンキナーゼを加えて可溶性の安定化酵素溶液を生成させる

ことを特徴とする可溶性安定化酵素溶液の製造方法。

(19) (a) 約 0.225 重量 % までのゼラチンと 1 グラム % の L - A B P と 1 重量 % の  $\alpha$  - ケトグルタル酸塩と 5 重量 % のアルブミンとを 1.1 容積 % のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンからなる緩衝水溶液中に溶解して第 1 溶液を生成させ、

(b) エチレン無水マレイン酸の重合体をジメチルスルホキシド中に 10 mg/ml の濃度で溶解して第 2 溶液を生成させ、

(c) 第 1 溶液と第 2 溶液とを混合して第 3 溶液を生成させ、かつ

(d) A B T 及び B O O T から選択される酵素を第 3 溶液に加えて安定化された可溶性酵素の溶液を生成させる

ことを特徴とする安定化可溶性酵素溶液の製造方法。

8

タル酸塩と 5 重量 % のアルブミンとを 1.1 容積 % のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンからなる緩衝水溶液中に溶解して第 1 溶液を生成させ、

(b) エチレン無水マレイン酸の重合体をジメチルスルホキシド中に 10 mg/ml の濃度で溶解して第 2 溶液を生成させ、

(c) 第 1 溶液と第 2 溶液とを混合して第 3 溶液を生成させ、かつ

(d) G P T 及び B O P T から選択される酵素を第 3 溶液に加えて安定化された可溶性酵素の溶液を生成させる

ことを特徴とする安定化可溶性酵素溶液の製造方法。

(23) (a) 約 0.225 重量 % までのゼラチンと約 5 重量 % までのアルブミンと約 0.1 重量 % の  $\text{NaNO}_2$  とを約 1.1 容積 % のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンからなる緩衝剤水溶液中に溶解して第 1 溶液を生成させ、

(b) エチレン無水マレイン酸の重合体をジメチルスルホキシド中に約 10 mg/ml の濃度で溶解して

10



第2溶液を生成させ、

(c) 第1溶液と第2溶液とを混合して第3溶液を生成させ、かつ

(d) LDH、 $\gamma$ -GTP及びALK-PHOSよりなる群から選択される酵素を第3溶液に加えて安定化された可溶性酵素の溶液を生成させることを特徴とする安定化可溶性酵素溶液の製造方法。

(24) NAD及びNADHから選択される少なくとも1種の酵素を第1溶液に加えることをさらに含んでなる特許請求の範囲第23項記載の方法。

(25) 酵素がALK-PHOSからなり、可溶性マグネシウム塩を第1溶液に加える特許請求の範囲第23項記載の方法。

(26) 酵素を、第1溶液と第2溶液との混合前に第1溶液に加える特許請求の範囲第18項乃至第25項のいずれかに記載の方法。

(27) 特許請求の範囲第1項乃至第26項のいずれかに記載の方法により製造された安定化可溶性酵素溶液。

11

において一年間に行なわれた全試験管診断試験のうち約25%が信頼できないものであつた。信頼できない試験は不必要な医療処置と必要処置の御上げと収入減とをもたらすであろう。酵素測定の使用はその高特異性のため過去数年間にわたり急成長し、この傾向は持続するであろうと示唆されている。しかしながら、結果の精度と一致性とを確保するには、厳しい品質管理手段が必要とされる。この要請は、酵素の正確な本質並びにその反応のメカニズムが大部分未知であることに起因する。

現在、診断用試薬製造上の最大の制約は、主として酵素溶液の不安定な特性にある。現在の診断法は不安定な成分の使用を必要としている。酵素の不安定性のため、この種の酵素溶液を製造する際及び乾燥媒体製剤を再編成する際並びにこの種の酵素溶液を配合する際、厳しい品質管理が必要とされ、このような品質管理は高価につく。さらに、この管理が工程のどこかの段階で高精度内に維持されないと、最終製品の品質が著しく低下して、分析結果の精度を低下させることになる。

13

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は、溶液中における不安定酵素の安定化に関するものである。特定の局面において、本発明は、臨床診断分析において使用しうる可溶性の安定化酵素に関するものである。

酵素は、通常未知の化学構造を有する高分子量かつ複雑な蛋白分子である。これらは、現在その触媒活性と極端な基質特異性によつて分離される。酵素は、単一基質の反応又は問題群の基質の反応を触媒しうる生物学的触媒であると定義することもできる。

診断分析において使用される酵素溶液の安定性は、個々の測定を経過時間にわたつて行なう場合、これらの測定値間で精度さと均一性を示すような分析法を提供する上で重要である。分析の再現性が得られないことに加え、酵素溶液の不安定性はさらに医療の費用を増大高めることになる。何故なら、不安定な酵素溶液は廃棄して、新たな溶液を配合する必要があるからである。

最近推計されたところでは、アメリカ合衆国に

12

酵素の反応能力を安定化させるため現在用いられる技術状態は、固体マトリックスに対する酵素の固定、凍結乾燥、主として製薬、診断及び関連工業において乾燥粉末を錠剤化するため用いられているような乾式配合、或いは固体マトリックスに対する酵素の化学構造の固定による不動化である。これらの用語が暗示する精巧さに反し、これらの方法は実用的でも望ましいものでもなく、かつまた高価につく。製造業者は、水を除去して半製品を供給せざるを得ず、したがつて最終製品の希釈及び使用において品質管理工程の一部を放棄せざるを得ない。工場は包装、試薬調製、凍結乾燥及び乾式配合に高経費を費さねばならない。さらに、製品の有用性は包装の様式及び寸法によつても制約される。

さらに、診断分析に製品を使用するような工場においては特に、良好な製品均一性を得ることが困難である。一般に、凍結乾燥の再編溶液は室温においてたとえば約24時間乃至5日間という比較的短い安定性しか持たない。したがつて、その

14





使用はこのような短い貯蔵寿命によつて制約される。

本発明は、不安定成分を液体試薬中に含有するにも拘らず酵素溶液を効果的に「安定化」させ、それにより液状溶液中での不安定成分の活性を管理するよう致すに設計したものである。安定性を付与するこの方法は液体媒体中において長期間の安定性を保証する。さらに、高品質製品の製造において精密な許容性管理が達成され、これにより厳格な包装寸法の不便さ、包装及び凍結乾燥の高経費並びに試薬廃棄が避けられる。

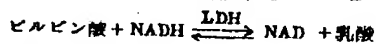
臨床上の診断分野において、酵素分析の実際的应用は、生物学的液体中の次の成分を決定かつ定量するのに使用する診断用試薬により代表されるが、これらのみに限定されるものではない：

1. グルタミン酸-オキザル酢酸トランスアミナーゼ (SGOT) 、
2. グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ (SGPT) 、
3. 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 、

15

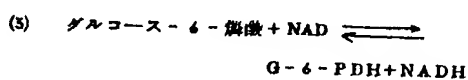
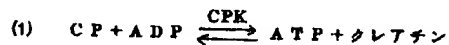
上記した全ての酵素反応はこの一般的系に従い、ここで反応(2)は通常結合反応と呼ばれ、反応(2)又は(3)は測定反応であり、反応(1)は主反応として特徴付けることができる。しかしながら、必ずしも3種の反応が全て測定に必要とされるわけではなく、実際上2種又は1種に限られることが理解される。乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性の紫外線測定の場合、次のように反応(2)のみが関与する。

#### 反応系 I - - LDH



逆に、上記した3種より多い反応も、たとえばクレアチンホスホキナーゼ (CPK) の場合のように関与することがある。

#### 反応系 II - - CPK

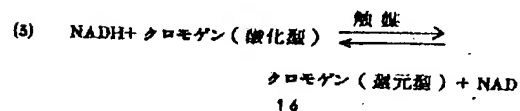
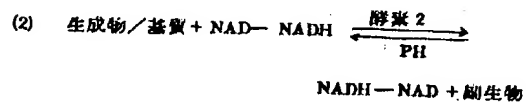
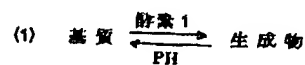


17

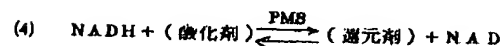
4. クレアチンホスホキナーゼ (CPK) 、
5. α-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ (α-HBD) 、
6. グルコース (ヘキソキナーゼ-G-6-PDH又はグルコースデヒドロゲナーゼによる) 、及び
7. 血中尿素窒素 (BUN) 。

上記成分につき診断分析を行なうための試薬は同じように反応し、幾種かの共通の不安定成分を含有しかつ関与する化学反応の幾つかは共通である。下記の反応系 I を、関与する反応の一般的性質を示すためのモデルとして示す。

#### 反 応 系 I



16



この場合、反応(2)及び(3)は結合反応と考えることができ、反応(3)又は(4)は測定反応であり、反応(1)は主反応である。

本明細書中及び上記反応系において次の記号を使用する。使用した記号は臨床診断分野において一般的に認められた記号である。

#### 記 号

CP	: 磷酸クレアチン
ADP	: アデノシン-5'-二磷酸
ATP	: アデノシン三磷酸
HK	: ヘキソキナーゼ
NAD	: ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチド
NADH	: ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチド、還元型
G-6-PDH	: グルコース-6-磷酸デヒドロゲナーゼ
INT	: テトラゾリウム塩
PMS	: フェナジンメト硫酸
L-ASP	: L-アスパラギン酸

18



OAA : オキサール酸

GLU : グルタミン酸

反応系 I について述べれば、この反応順序の使用が反応基質/生成物又は触媒酵素のいずれかに関する定量分析を可能にすることは明らかでありかつ一般的知識である。

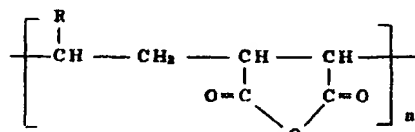
生物学的液体におけるこれら成分の定量は、人間及び動物の病的状態の診断及び処置において充分に許容されかつ広く使用される診断手段である。

不安定な酵素は本発明により処理されて、酵素反応性又は測光吸光度に影響を与えることなく長期間の安定性をもたらす。本発明は、製造、包装、貯蔵及び使用の全体を通じて品質管理が確保されるような試薬を提供する。厳格な包装寸法の不便さが除かれ、同様に包装、凍結乾燥及び試薬廃物の高経費も除かれる。液状の安定化された可溶性酵素の溶液は使用上の融通性を与える。各成分の分離は、無視しうる製造費を以て容易に行なわれる。本発明における液状の安定化された可溶性酵素の溶液は、全ての副反応が消散された後、所望

19

薬のための基質、基質と酵素との間の酵素反応により生ずる生成物、酵素のための活性剤及び(又は)酵素の抑制剤とすることができる。さらに、重合体の修飾基と競合的に反応する組成物を加えることもできる。すなわち、重合体上の修飾基と結合させるには、酵素上の修飾基と競合する組成物を加えることができる。たとえば、アルブミン及びゼラチンのような蛋白質様の組成物を加えて、重合体の修飾基との反応において競合させることができる。

酵素上の修飾基と共有結合しうる修飾基を持った重合体は、式



(式中、 $n$ は整数であり、 $R$ は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アルカリール、アラールキル及び

21

特開昭57-122795(6)

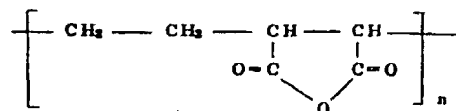
の酵素反応を開始させる融通性を与える。

本発明の安定化された可溶性酵素は、酵素試薬を新鮮酵素と比較する研究で評価される。これらの研究は、古い水性試薬と新鮮試薬との間で1:1の相関関係を示し、同等な感度と精度とを有することを示す。

診断酵素学において、既製液体媒体における酵素試薬の安定化は、臨床実験室の需要及び管轄官庁の信頼性要求を満足させる新規かつ画期的な方法である。安定化された液体酵素系の融通性は、自動化機器に対する応用を保証すると共に、貯蔵寿命の制約による試薬廃棄なしに手動試験における便利さをも保証する。

溶液中の不安定酵素の安定化は、本発明によれば、液体媒体中において、安定化すべき酵素をこの酵素上の修飾基と共有結合しうるような修飾基を有する重合体と反応させることにより達成される。酵素と重合体とをさらに、酵素の活性に作用を及ぼす少なくとも1種の組成物と混合する。酵素の活性に作用を及ぼしうるこの種の組成物は酵

20

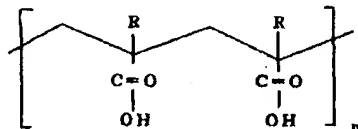


から選択される基とすることができる)

の構造単位を有する重合体とすることができる。

このような構造を有する特に好適な重合体は、エチレンと無水マレイン酸との共重合体である。重合体の無水マレイン酸部分は酵素の修飾アミノ基と反応する。

本発明において有用な他の重合体は、ポリアクリル酸及びポリメタクリル酸の無水物である。この種の重合体は別途に調製することができ、或いはその場で生成される中間体とすることもできる。たとえば、この種の重合体の使用しうる構造及び生成系は次の通りである:

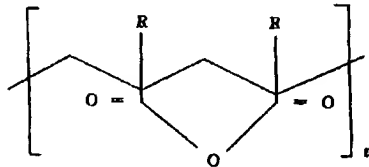


22



〔式中、RがHである場合は重合体はポリアクリル酸であり、RがCH<sub>3</sub>である場合は重合体はポリメタクリル酸である〕。

この種の重合体に熱と減圧とをかけると、或いはたとえばジシクロヘキシルカルボジイミドのような適当な脱水剤によりこの種の重合体を脱水すると、下記の構造を有する中間体がその場で生成する：



本発明の方法により生成される溶液中で安定化させうる酵素は、たとえばオキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ及びヒドラーゼのような酵素を包含する。さらに、インターナショナル・ユニオン・オブ・バイオケミストリーにより付与された番号で同定されるような次の酵素も本発明の方法により溶液中で安定化させることができる：

23

- |                   |                |
|-------------------|----------------|
| 18. コレステロールエステラーゼ | E. C. 3.1.1.13 |
| 19. リパーゼ          | E. C. 3.1.1.5  |
| 20. ウリカーゼ         | E. C. 1.7.3.3  |
| 21. ウレアーゼ         | E. C. 3.5.1.5  |
| 22. グリセリンキナーゼ     | E. C. 2.7.1.30 |

ここに例として示したこれら酵素群の他、たとえばリアーゼ、リガーゼ及びイソメラーゼのような酵素も本発明により安定化させることができる。

液体媒体中における酵素の安定化は、酵素の活性に作用を及ぼす少なくとも1種の組成物を重合体及び酵素と混合することにより高められ、この組成物は酵素のための基質、酵素と基質との生成物、酵素のための活性剤及びこの種の酵素の抑制剤よりなる群から選択される。

酵素を安定化させるための液体媒体は、ジメチルスルホキシド、アセトン、ジメチルホルムアミド及びピリジンから選択される有機溶剤の水溶液からなっている。さらに、液体媒体は、約5〜約10のpHを与える緩衝剤からなることもできる。緩衝剤はトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタ

25

特開昭57-122795(7)

- |   |                |
|---|----------------|
| 1. リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)                        | E. C. 1.1.1.37 |
| 2. クレアチンキナーゼ(CK, CPK)                       | E. C. 2.7.3.2  |
| 3. アルカリホリファターゼ<br>(AP, ALP, ALK-Phos.)      | E. C. 3.1.3.1  |
| 4. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT, OT, GOT, SGOT) | E. C. 2.6.1.1  |
| 5. アラニンアミノトランスフェラーゼ<br>(ALT, PT, GPT, SGPT) | E. C. 2.6.1.2  |
| 6. γ-グルタミルトランスベプチダーゼ<br>(rGT, rGTP)         | E. C. 2.3.2.1  |
| 7. α-アミラーゼ                                  | E. C. 3.2.1.1  |
| 8. β-アミラーゼ                                  | E. C. 3.2.1.2  |
| 9. 乳酸デヒドロゲナーゼ<br>(LD, LDH, ラクチクデヒドロゲナーゼ)    | E. C. 1.1.1.27 |
| 10. グルコース-6-磷酸デヒドロゲナーゼ<br>(G6PDH)           | E. C. 1.1.1.49 |
| 11. ヘキソキナーゼ(HK)                             | E. C. 2.7.1.1  |
| 12. グルコースデヒドロゲナーゼ                           | E. C. 1.1.1.47 |
| 13. グルコースオキシダーゼ                             | E. C. 1.1.1.34 |
| 14. ペルオキシダーゼ(HRP, HPO, PO)                  | E. C. 1.1.1.17 |
| 15. グリセリンデヒドロゲナーゼ                           | E. C. 1.1.1.6  |
| 16. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ                          | E. C. 1.4.1.3  |
| 17. コレステロールオキシダーゼ                           | E. C. 1.1.3.6  |

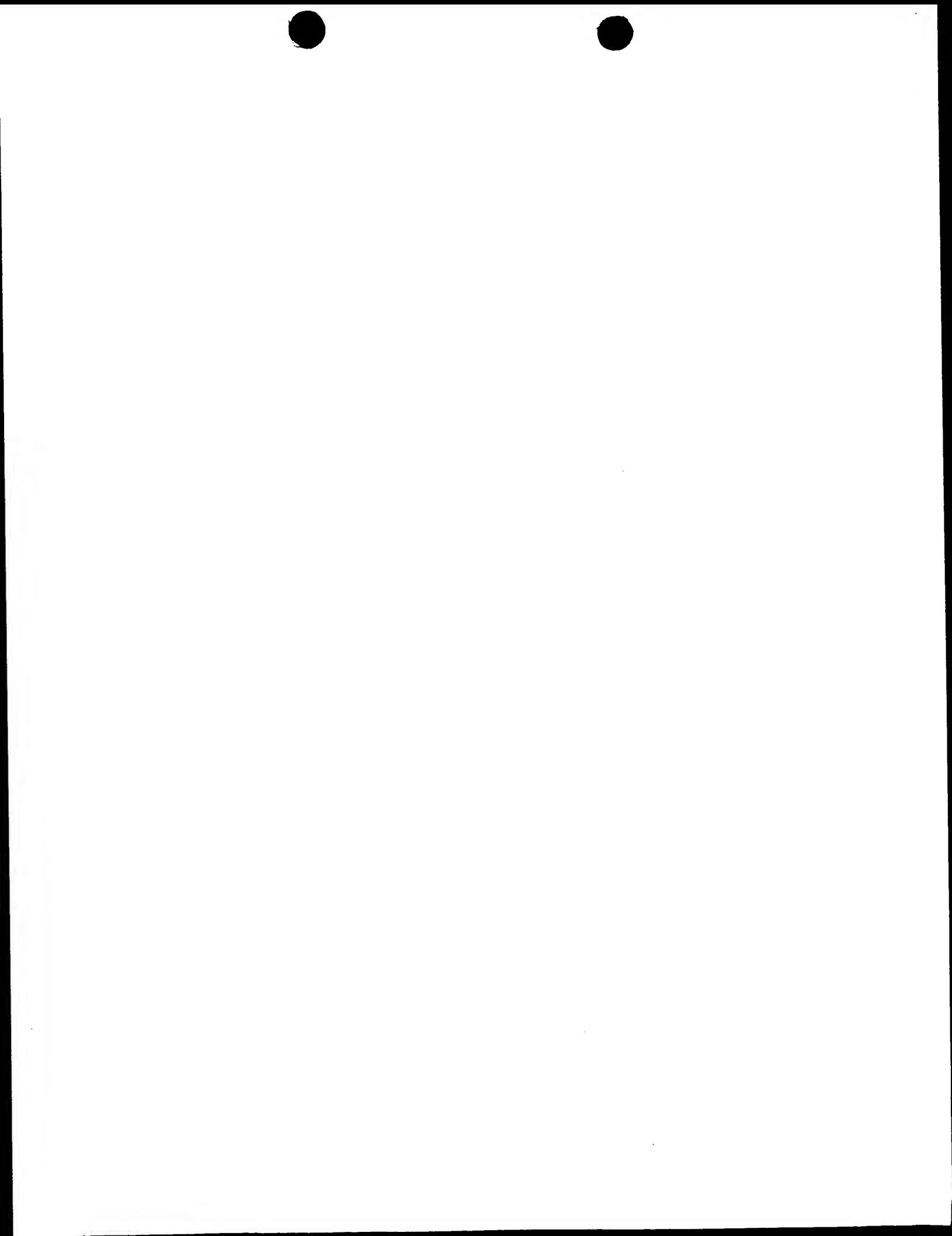
24

ン、イミダゾール、トリエタノールアミン及び緩衝剤よりなる群から選択される。

追加組成物を酵素と重合体の反応混合物又は溶液に加えることができる。この種のその他組成物は、たとえばアルブミン及びゼラチンから選択される蛋白質様物質のような蛋白質様物質を包含する。

ここに示した本発明の応用は主として臨床生化学の分野に關するが、本発明の用途は他の分野にも拡張されることが当業者には明白であらう。広汎な種類の工業上、製薬上及び化粧品に關する工程及び製品は溶液中の、懸濁液中の及び固体表面上に不動化させた酵素を利用する。たとえば本発明により提供されるような酵素の高温度安定性という性質が広く求められている。ここに開示した方法により安定化された酵素は、主として均質な水溶液を生成するが、透析及びイオン交換を含む各種の技術により反応体及び生成物から容易に分離される。安定化酵素が耐えうる高温度は、バッチ式及び連続式工業工程において、より短い反応時

26



間を可能にする。調合製品中にこの種の安定化酵素を使用すれば、より長い製品貯蔵寿命及び(又は)大して厳格でない貯蔵条件が可能となる。

ここに開示した方法により製造される安定化した可溶性酵素は、生物学的液体中の各種成分を測定する臨床分野において使用することができる。

安定化した可溶性酵素は、酵素上の側基と共有結合しうる側基を有する重合体と酵素とを液体媒体中で反応させることにより製造される。この種の重合体と酵素との反応に加え、酵素の活性に作用を及ぼす少なくとも1種の組成物を酵素及び重合体と混合することもできる。たとえば、この種の組成物は特定酵素用の基質、基質と酵素との反応生成物、酵素用の活性剤及びこの種の酵素の抑制剤よりなる群から選択することができる。酵素及び重合体と混合するため選択される特定組成物は酵素の種類に依存する。何故なら、酵素の活性に作用を及ぼす組成物は特定酵素に対し特異的でありうるからである。

酵素及び重合体並びに酵素の活性に作用を及ぼ

27

8.  $\beta$ -アミラーゼ、
9. 乳酸デヒドロゲナーゼ(LD、LDH、ラクトックデヒドロゲナーゼ)、
10. グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PDH)、
11. ヘキソキナーゼ(HK)、
12. グルコースデヒドロゲナーゼ、
13. グルコースオキシダーゼ、
14. ペルオキシダーゼ(HRP、HPO、PO)、
15. グリセリンデヒドロゲナーゼ、
16. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、
17. コレステロールオキシダーゼ、
18. コレステロールエステラーゼ、
19. リパーゼ、
20. ウリカーゼ、
21. ウレアーゼ、
22. グリセリンキナーゼ。

化学的に、これまで知られている酵素は全て蛋白質である。多くの酵素は、アミノ酸の特定順序を有する複合蛋白質である。酵素は蛋白質、すな

29

特開昭57-122795(B)

す組成物の他、重合体の可使側基と反応しうる組成物を加えることもできる。たとえば、この種の追加組成物は蛋白質様組成物、たとえばアルブミン、ゼラチンなどとすることができる。

本発明の方法により安定溶液中に配合しうる酵素はデヒドロゲナーゼ、トランスアミナーゼ及びペプチダーゼのような酵素を包含する。特に、本発明の方法により可溶型で安定化させうる特定酵素は下記のものを含む：

1. マレイン酸デヒドロゲナーゼ(MDH)、
2. クレアチンキナーゼ(CK、CPK)、
3. アルカリホスファターゼ(AP、ALP、ALK-Phos.)、
4. アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST、OT、GOT、SGOT)、
5. アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT、PT、GPT、SGPT)、
6.  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ GT、 $\gamma$ GTP)、
7.  $\alpha$ -アミラーゼ

28

わち、アミノ酸から構成されているので、アミノ側基を有する。たとえば、蛋白質はリジン及びアルギニンを含むアミノ酸から構成され、ペプチド結合を介して結合されており、そのままで修飾アミノ基を与えることができる。酵素の略図を第1図に示す。第1図において、酵素10はペプチド結合を介して結合されたアミノ酸の閉鎖分子構造として示されている。酵素10は活性部位12を有し、この部位は酵素用に選択した基質と反応することができる。基質を引きつけてこれと反応する酵素の能力は酵素の活性に関係する。

基本的に、酵素には3種の構造がある。第1の構造は、各種のペプチド結合を介して酵素を生成するアミノ酸及び蛋白質の結合によるものである。酵素の第2の構造は、分子構造のアミノ酸間における架橋によつてもたらされる。酵素の第3の構造は、空間における酵素の配向によつてもたらされる。すなわち、酵素の第3の構造は、酵素分子がそれ自身及びその部分に関して占める配置に基づいている。酵素の変性又は失活は、このような

30





酵素の第3構造の破壊によつて生じうると思われる。したがつて、酵素の第3構造を維持させることができれば、酵素は安定化されたと云える。さらに、酵素は、幾つかの他の組成物が酵素と反応し又は酵素に結合してこの酵素の活性部位を効果的にブロックするとその活性を喪失することもある。さらに、酵素上の他の部位における組成物の反応が活性部位に何らかの作用を及ぼすこともある。たとえば、組成物は第2図に示すように酵素分子を閉鎖する作用を酵素分子に及ぼすような酵素上の位置で反応して、活性部位を有効にブロックすることもある。この種の作用はアロステリック阻止と呼ばれる。さらに、他の組成物は活性部位以外の部位で酵素と反応することもあり、この組成物は活性部位において基質に対し酵素の静電親和性に影響を及ぼし又はこれを変化させる。

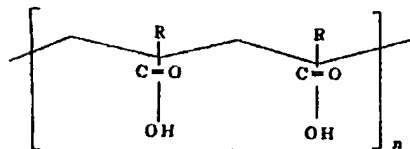
酵素は三次元の化学構造を有しかつ酵素の活性は酵素の形状及び配位(第3構造)に依存するので、本発明の方法は酵素の第3構造を保護又は維持することによる酵素の安定化方法を提供するも

31

から選択される基とすることができる)

の構造単位を有する重合体は、酵素構造内においてたとえば構造内のアミノ基を介して蛋白質分子と共有結合することができる。

本発明において有用なその他の重合体はポリアクリル酸及びポリメタクリル酸の無水物である。この種の重合体は別途に或いはその場で生成される中間体として調製することができる。たとえば、この種の重合体の使用しうる構造は次の通りである:



(式中、RがHである場合は重合体はポリアクリル酸であり、RがCH<sub>3</sub>である場合は重合体はポリメタクリル酸である)

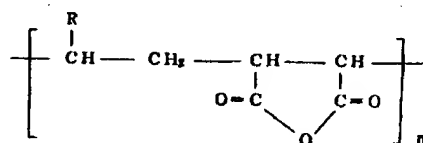
この種の重合体に熱と減圧とをかけると、又はたとえばジシクロヘキシルカルボジイミドのような適当な脱水剤によりこの種の重合体を脱水する

33

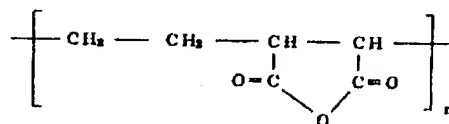
特開昭57-122795(9)

のである。安定化すべき酵素を、酵素と反応しうる修飾基を有する重合体と反応させる。たとえば、重合体は酵素構造中に存在する修飾アミン及び(又は)酵素と反応しうる側基を有することができる。今回、重合体骨格に沿つて又は骨格中に側無水物基又は無水物成分を有する重合体は、この種の側無水物基と酵素上の側基との共有結合を可能にすることが見出された。

無水物側基を有する重合体又は式

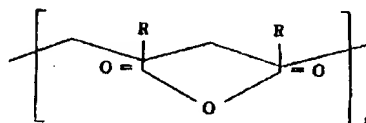


(式中、nは整数であり、Rは水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アール、アルカール、アラルキル及び



32

と、次の構造を有する中間体がある場合で生成される:



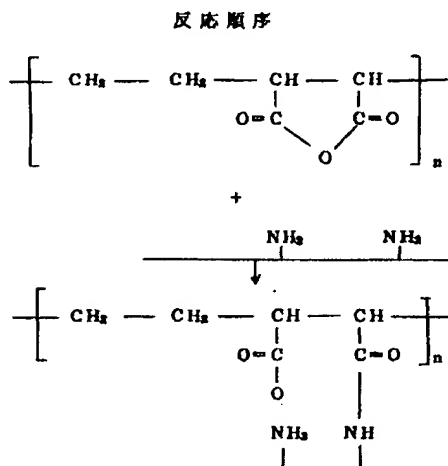
上記式を有する時に好適な重合体はエチレン-無水マレイン酸である。エチレン-無水マレイン酸共重合体は、E M A樹脂と称する製品としてモンサントカンパニー社から市販されている。ここに開示した本発明の目的には、この種の市販のエチレン-無水マレイン酸樹脂が許容される。エチレン-無水マレイン酸共重合体は、約8000、25000及び100000の平均分子量を有するものが市販されている。さらに、架橋したエチレン-無水マレイン酸共重合体も市販されており、この種の架橋重合体も本発明の方法において有用である。今回、高分子量のエチレン-無水マレイン酸共重合体は、低分子量の無水マレイン酸重合体よりも良好な安定性とより大きな活性の回収率

34



とを与えることが見出された。しかしながら、低分子量の無水物重合体を本発明の方法に使用して、許容しうる安定性と活性回収率とを与えることもできる。

エチレン-無水マレイン酸重合体は酵素構造から突出するアミノ側基と反応すると思われ、これは次の反応順序で示される：



35

図に關し酵素10を示すが、ここでは重合体14が酵素と反応して活性部位を有効にブロックし、基質が酵素と反応するのを阻止している。酵素に対する活性の抑制剤としての重合体の存在は、酵素をこの種の重合体と反応させた際の低活性収率により確證された。重合体と反応した酵素はこの種の重合体と反応していない酵素よりも大きな安定性を示すが、得られる反応酵素の活性収率は反応前の酵素の初期活性に比較して一般に低いものである。しかしながら、重合体と反応した後の酵素の活性は未反応酵素よりも安定である。

本出願人は、酵素と重合体との反応混合物に追加組成物を加えることにより可溶性酵素をより効率的かつ効果的に安定化させることを見出した。さらに本出願人は、反応の順序を変化させることにより、得られる安定化可溶性酵素の活性収率及び(又は)安定性をより大きくしうることを見出した。さらにまた本出願人は、酵素と重合体との反応混合物に加えるその他組成物が酵素用の基質、酵素と基質との反応生成物、酵素用の活性剤

37

特開昭57-122795(10)

充分には判明していないが、この重合体は酵素に対し共有結合してその活性配向を維持すると信じられる。本発明の方法によりもたらされる可溶性酵素の安定化理論を第3図乃至第5図に示すが、この理論のみに拘束されるものではない。第3図に關し、酵素10は活性部位12を持つて示されている。酵素は、この酵素に共有結合しうる修飾基を有する重合体14と反応する。重合体を酵素と反応させると、共有結合16が重合体と酵素との間に形成される。得られる酵素と重合体との反応生成物は、この種の重合体を含まない酵素の溶液よりも大きな安定性を示すことが実験的に示された。重合体の存在は酵素の第3構造を保持する傾向を有し、したがって酵素の活性を維持することができると思われ。

しかしながら、重合体はその修飾基を介して酵素の修飾基と反応しうるので、重合体がたとえばアロステリック阻止により活性部位をブロックするか又は活性部位を有効に閉鎖するような位置で、この重合体が酵素と反応する可能性もある。第4

36

及び酵素の抑制剤よりなる群から選択される組成物を包含することを見出した。反応混合物に加えられる特定の基質、生成物、活性剤及び(又は)抑制剤は、安定化させるべき酵素に依存する。ここで、酵素と基質との酵素反応は生成物を与える可逆反応であるため、基質、生成物、活性剤及び(又は)抑制剤の存在は活性部位を開放状態に保つと共に、重合体が酵素と反応して活性部位をブロックし又は他の何らかの悪影響を及ぼすのを防止又は抑制すると信じられる。

酵素と重合体との反応混合物に加えるべき基質、生成物、活性剤及び(又は)抑制剤の量の選択は酵素の種類及び基質と重合体との酵素反応に依存する。たとえば、生成物を過多に添加すれば酵素と基質との反応の平衡が変化し、この添加生成物をたとえば透析により安定化酵素から分離しない限り、本発明の方法で製造された安定化可溶性酵素溶液を用いて行なわれる臨床診断分析の時間が増大する。

さらに、重合体上の可使修飾基とも反応しうる

38



組成物を反応混合物に加えることにより、可溶性酵素をさらに安定化させかつ活性回収率を高めうるが見出された。この種のその他組成物は、重合体上の修飾基と反応しうる任意の組成物とすることができる。たとえば、アルブミン、セラチンのような他の蛋白質様組成物及びたとえばデキストランのような重合体を加えて、重合体の側基と反応させることができる。基質、生成物、活性剤及び（又は）抑制剤も重合体上の修飾基と直接に反応することができる。勿論、この種の組成物が重合体と反応するかどうかは基質、生成物、活性剤及び（又は）抑制剤の性質に依存する。重合体上の側基と反応しうるこの種の組成物は、酵素をその第3構造に維持することにより酵素を安定化させるのに役立つと信じられる。さらに、この種の組成物は重合体と反応して、酵素の第3構造を保持するマトリックス状の環境を形成することができる。第5図に、この種のマトリックス状環境の略図を示す。第5図において、酵素10は活性部位12を有し、酵素と重合体14との反応に

39

成物の反応順序は酵素活性の安定性又は回収率に対し実質的に影響を与えない。

本発明の方法により安定化された酵素は可溶性の安定化酵素である。酵素は可溶型であるため、臨床診断分析に容易に使用することができる。安定化された可溶性酵素は、従来の酵素溶液と比較して、比較的長い寿命と活性保持とを示す。酵素と重合体との間の反応が起こる液体媒体環境は、酵素と重合体とが溶解しうる任意適当な液体環境とすることができる。好適な液体環境はジメチルスルホキシド、アセトン、ジメチルホルムアミド及びピリジンよりなる群から選択される有機溶剤の水溶液を包含する。特定有機溶剤の選択は酵素の種類に依存する。たとえば、幾種かの酵素は、たとえばアセトンのような特定の有機溶剤と混合するとその活性を喪失することがある。しかしながら、本発明の方法により得られる全体的な安定性と活性回収率とは、特定酵素に対する特定有機溶剤の影響より勝れている。上記有機溶剤のうち好適な有機溶剤は、酵素と反応させる重合体が

41

よりその第3構造に維持されている。重合体14は側基を介して酵素に共有結合し、重合体と酵素との間に結合16を形成する。基質、生成物、活性剤及び（又は）抑制剤の存在は、酵素と重合体との反応の間、活性部位12を開放状態に保つことができる。代案として、反応性組成物R、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>を反応混合物に加えて重合体と反応させることができる。このような付加的反応性組成物は、マトリックス状環境を形成するのに役立つ。

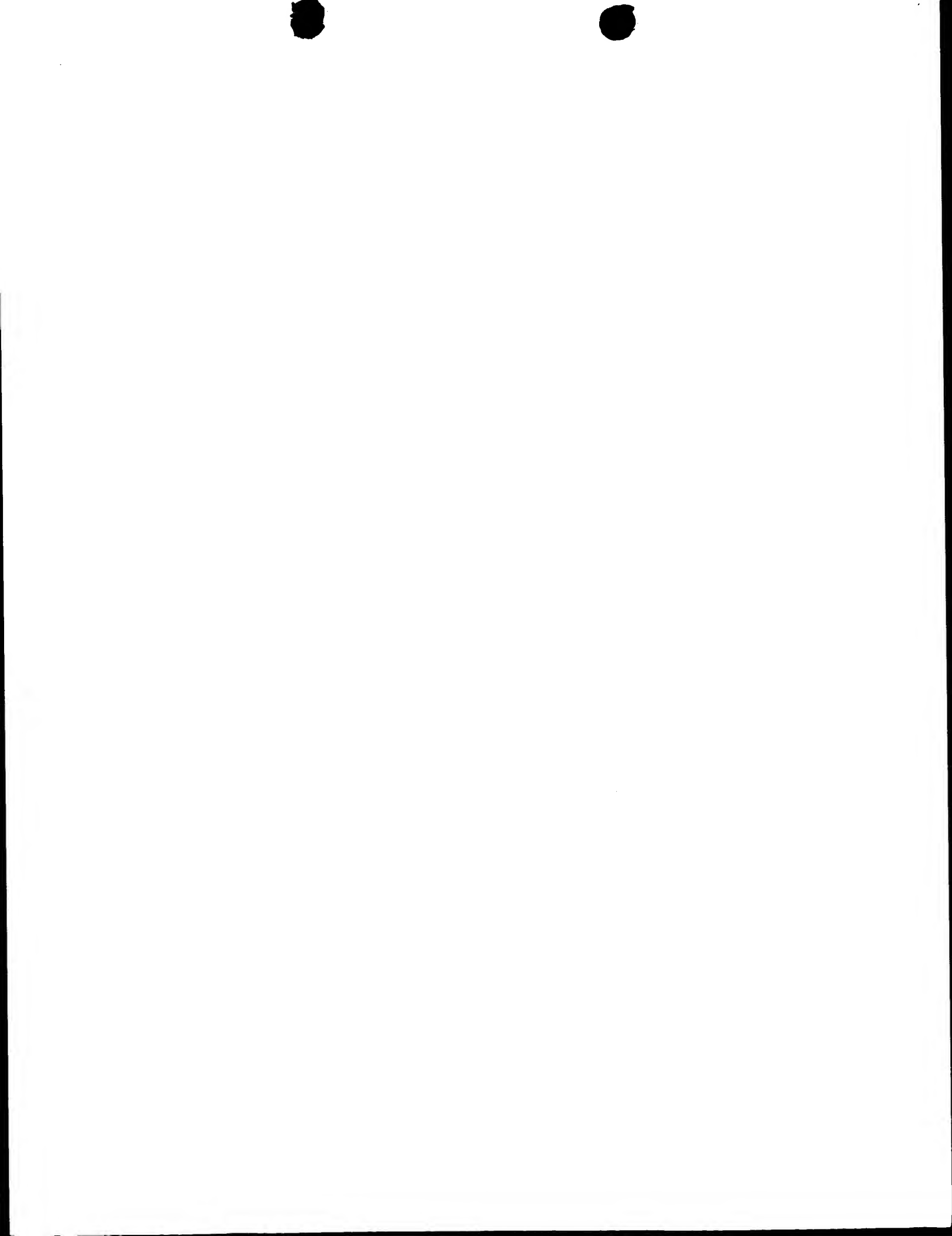
本出願人は、或る酵素に関し、重合体と反応しうるこの種のその他組成物と重合体とを、この重合体と酵素との反応前に反応させるのが好ましいことを見出した。重合体をこの種のその他組成物と最初に反応させることにより、重合体上の可使活性側基の幾つかが反応し、それによりこれらが酵素上の可使側基と反応することが阻止される。重合体上のこのような反応性側基を酵素との反応前に結合させることにより、重合体が適度に反応して酵素の活性部位に影響を及ぼす機会を減少させることができる。他の酵素の場合は、各側基

40

エチレンと無水マレイン酸との共重合体である場合にはジメチルスルホキシドである。ジメチルスルホキシドは、酵素と重合体とに対する良好な溶剤であつてしかも酵素の活性に対し実質的に悪影響を与えない。

さらに、液体媒体は適当な緩衝溶液で緩衝することもできる。たとえば、液体媒体は約5〜約10のpHを与える水性緩衝剤からなることができる。緩衝剤はトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、イミダゾール、トリエタノールアミン及び磷酸緩衝剤よりなる群から選択することができる。緩衝剤のうち、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンの水溶液からなる緩衝剤を使用するのが好適である。この種の緩衝剤は酵素に対し許容しうる安定性を与え、しかも酵素の可溶性と活性並びに重合体の可溶性に対し悪影響を与えない。緩衝溶液を使用して、反応混合物と液体媒体との全体のpHを約5〜約10の範囲内に保つ。重合体が無水物である場合pHが変動しうるので、緩衝溶液の使用が望ましい。たとえば、水溶液にお

42



いては、適切に緩衝されていないと、無水物が加水分解して溶液のpHに作用を及ぼす。

可溶性安定化酵素の製造方法を以下の例でさらに説明し、これらの例は特定の酵素及び酵素系に関して方法を説明するものであるが、これらのみに限定されない。

#### 例 1

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼに関して臨床診断分析に有用な安定化可溶性酵素溶液を次の反応順序で調製した：



この分析に使用した酵素MDHは不安定な酵素である。溶液の場合、これは本発明の方法により次のように安定化される。

0.225重量%のゼラチンと0.1重量%の塩化ナトリウム(NaCl)と500mg/dlのNADHと500mg/dlのNADとを1.1容量%のトリス

45

得られた溶液はMDHにつき約150~350 IU/mlの活性を示した。得られた溶液の安定性は、これに400mgのL-ASPと0.3重量%のゼラチンとからなるトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの0.3%緩衝水溶液中における約pH 7.8の溶液を加えることによりさらに改善することができた。

得られた溶液は、従来のMDH溶液よりも大きな活性保持を示した。一般に、この種の従来のMDH溶液は、約41℃に2時間加熱するとその全活性を喪失する。この例で調製されたMDH溶液は、約41℃にて93時間まで加熱しても、約50%の活性保持を示した。

#### 例 2

例1の手順をあらゆる主要点において反復したが、ただしMDH酵素溶液を、第1溶液をDM80中のエチレン無水マレイン酸重合体の第2溶液と混合して反応させる前に、この第1溶液と反応させた。

得られた溶液は例1で調製した溶液よりも低い

45

特開昭57-122795(12)

(ヒドロキシメチル)アミノメタンからなる水性緩衝溶液中で混合することにより第1溶液を調製した。

平均分子量約100,000を有するエチレン無水マレイン酸重合体(BMA-31、モンサントカンパニー社から市販されている)をジメチルスルホキシド(DMSO)と混合することにより第2溶液を調製した。エチレン、無水マレイン酸重合体を加えて、約10mg/mlのこの重合体の濃度を有する溶液を作った。

等容量(各1ml)の第1溶液と第2溶液とを混合し、約2.5分間静置させた。この時間は、エチレン無水マレイン酸重合体と第1溶液における幾つかの成分との間の反応を可能にした。

50容量%のグリセリンと50容量%の水とからなる溶剤に溶解させたMDHの溶液を、第1溶液と第2溶液との混合により生成された混合物に加えた。MDH溶液は約15,000 IU/mlの活性を有した。約10分間後、酵素とエチレン無水マレイン酸との間の実質的に全ての結合が完結した

44

活性を示し、例1の酵素溶液における10~25%収率と比較し、約5%という活性収率であった。

#### 例 3

例1の手順をあらゆる主要点において反復した。安定化した可溶性酵素はクレアチンキナーゼであり、これは熱及びその他因子に対し一般に極めて不安定である。

0.225重量%のゼラチンと0.1重量%のNaClと5重量%のアルブミンと1重量%のデキストランと1重量%のADPと0.1重量%のメルカプトエタノールとを1.1容量%のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンの緩衝剤水溶液中に溶解させて第1溶液を調製した。

DMSO中のBMA-31の第2溶液は例1と同様に調製した。

第1溶液と第2溶液とを等容量で配合し、静置させた。次いで、クレアチンキナーゼ(CK)を約5000 IU/mlの量で加えた。

得られた溶液はゲル状のコンシステンシーを有した。得られた溶液におけるCKの活性は初期活

46





性に対比して計算して約500 IU/mlであり、1対1希釈を考慮して計算すると活性は約250 IU/mlであった。

もしメルカプトエタノールを除去すれば、得られる溶液は同等なゲル状コンシステンシーを示さないことが判った。

さらに、酵素の添加順序は最終的に示される活性に影響を及ぼさないことも決定された。たとえば酵素は、第1溶液と第2溶液との混合前に第1溶液に加えた場合、この例に示したとほぼ同じ安定性を示した。

得られた溶液は、約41℃に72時間加熱した場合、その酵素活性の約60%の保持という安定性を示した。通常、CKの溶液は、約41℃に加熱されると約1時間以内にその酵素活性のほぼ全部を失なう。

#### 例 4

例1の手順をあらゆる主要点において反復した。安定化した酵素は血清グルタミン酸オキザル酢酸トランスアミナーゼ (BGO T) であった。

47

熱されると、その活性の約50%を保持する。

燐酸ピリドキサールの活性剤を第1溶液に加えることにより活性収率の増加を達成することができた。

#### 例 5

例4の手順をあらゆる主要点において反復したが、ただし酵素をアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) とした。

#### 例 6

例4の手順をあらゆる主要点において反復したが、ただしL-ASPの代わりにL-アラニンを使用しかつBGO Tの代わりにグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) 又は (BGPT) を使用した。

#### 例 7

例4の手順をあらゆる主要点において反復したが、ただしL-ASPの代わりにL-アラニンを使用した。

#### 例 8

例1の手順をあらゆる主要点において反復した。

49

特開昭57-122795 (13)

約0.225重量部のゼラチンと1重量%のL-ASPと1重量%のα-ケトグルタル酸 (α-KG) と5重量%のアルブミンとを11容量%のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンの緩衝剤水溶液中に溶解して第1溶液を調製した。

第2溶液は例1の手順によりDM80中にエチレン無水マレイン酸を溶解して調製した。

第1溶液と第2溶液とを等容量 (各/ml) で混合し、得られた第3溶液を約2分間静置させた。

約1000 IU/mlの活性を有するBGO T溶液約0.1 mlを第3溶液に加えた。約10分間後、得られた酵素溶液は約100~150 IU/mlの活性を示した。

この得られた酵素溶液を、アルブミン溶液 (ひと血清アルブミン、牛血清アルブミン) 若しくはゼラチンにより、約5~約10のpHを与える緩衝剤溶液中で希釈することができる。

得られた溶液は、約41℃に72時間加熱した場合、酵素活性の約100%の保持を示した。通常、この酵素の水溶液は、約41℃に約5時間加

48

この実験で安定化させた酵素は乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) であった。一般にLDHは、約7.0±2のpHに緩衝すれば50%グリセリン溶液中で安定である。しかしながら、この種のLDH酵素溶液はたとえばアルブミンのような緩衝された蛋白質様マトリックスで希釈すると失活する。たとえば、約400 IU/mlの活性を有する正常に希釈されたLDH溶液は、約41℃に24時間加熱されると約50~100 IU/mlの活性を示す。

0.225重量%のゼラチンと5重量%のアルブミンと0.1重量%のNaN<sub>3</sub>とを11容量%のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンからなる緩衝水溶液中に溶解して第1溶液を調製した。

DM80中のエチレン無水マレイン酸の第2溶液は例1におけると同様に調製した。

第1溶液と第2溶液とを1:1の容量比で混合し、約2分間静置して反応させた。約5000 IU/mlの活性を有するLDHの緩衝液約0.1 mlを加えた。得られた溶液を緩衝された蛋白質様マトリックス中に希釈しかつこの希釈酵素溶液を約

50



41℃に加熱したが、約72時間後にその活性の實質的に全部を保持した(約400 IU/μ)。

さらに、活性の収率は、NAD及び(又は)NADHを第1溶液に加えることにより増大されることも決定された。

#### 例 9

例8の手順をあらゆる主要点において反復したが、ただし酵素LDHの代りに酵素r-GTPを使用した。

同様な安定性試験において、r-GTPの安定化酵素溶液は、約41℃に72時間加熱したが、その活性の實質的に全部を保持した(約400 IU/μ)。

#### 例 10

例8の手順をあらゆる主要点において反復したが、ただし酵素LDHの代りに酵素ALK-PHOSを使用した。

得られた酵素溶液は同様な安定性を示した。

しかしながら、第1溶液に対するNAD及び(又は)NADHの添加は活性に対し何ら認めう

51

22	ウレアーゼ
23	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
24	グリセリンキナーゼ

る程度に作用を及ぼさなかつた。活性剤マグネシウム(マグネシウムの可溶性塩)の添加は酵素活性の収率及び安定性を増大させることが決定された。

#### 例 11~24

これらの例の全てにおいて、例1の手順をあらゆる主要点において反復したが、ただし下記の酵素を使用した。

例 号	酵 素
11	アミラーゼ
12	Q-6-PDH
13	ヘキソキナーゼ(HK)
14	グルコースデヒドロゲナーゼ
15	グルコースオキシダーゼ
16	ペルオキシダーゼ
17	コレステロールエステラーゼ
18	コレステロールオキシダーゼ
19	グリセリンデヒドロゲナーゼ
20	リパーゼ
21	ウリカーゼ
52	

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は酵素の略図であり、第2図は第1図の酵素の略図であつてその活性部位をブロックする酵素自身を示し、第3図は第1図の酵素と反応性修飾基を有する重合体との反応の略図であり、第4図は第3図の酵素の略図であつて、どのように重合体が活性部位をブロックするかを示し、第5図はどのように追加組成物が重合体と反応しかつ活性部位を基質と自由に反応させようよう維持するかを示す略図である。

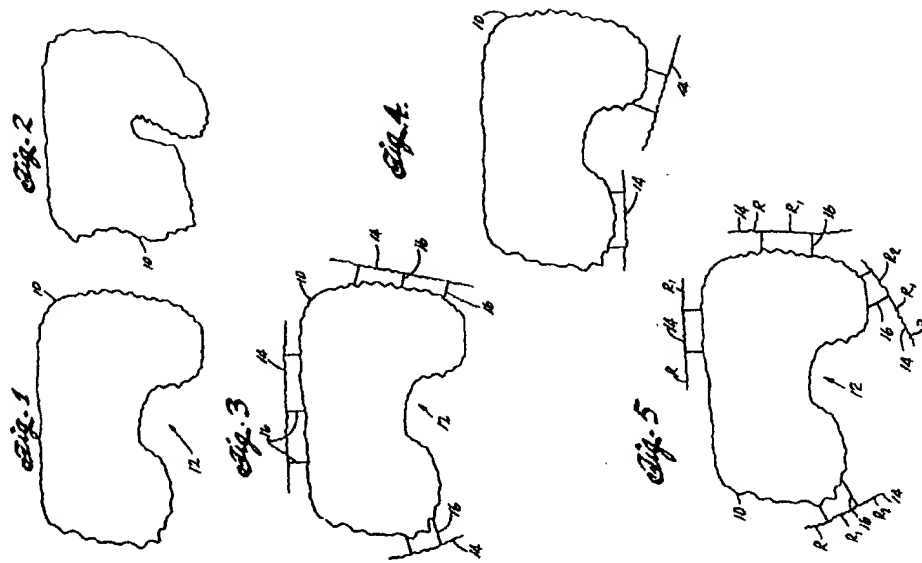
10…酵素

12…活性部位

14…重合体

16…共有結合





手続補正書 (方式)

昭和57年5月5日

特許庁長官 島田 春樹 殿

事件の表示 昭和56年 特願第156335号

発明の名称 可溶性安定化酵素

補正の対象

~~願書の発明者 出願人の欄~~

~~明細書の発明の名称 特許請求の範囲 発明の詳細な説明の欄~~

委任状及びその訳文

各1通

図面

1通

補正をする者

事件との関係

特許出願人

氏名

~~右~~ 伊藤・エンドレ・モドロビツチ

代理人

〒103

住所 東京都中央区日本橋3丁目13番11号 油脂工業会館  
電話 273-6436番

氏名 (6781) 芥理士 介 内 基 弘

同

住所 同 上

氏名 (7563) 芥理士 介 慎 暎

補正の内容 別紙の通り

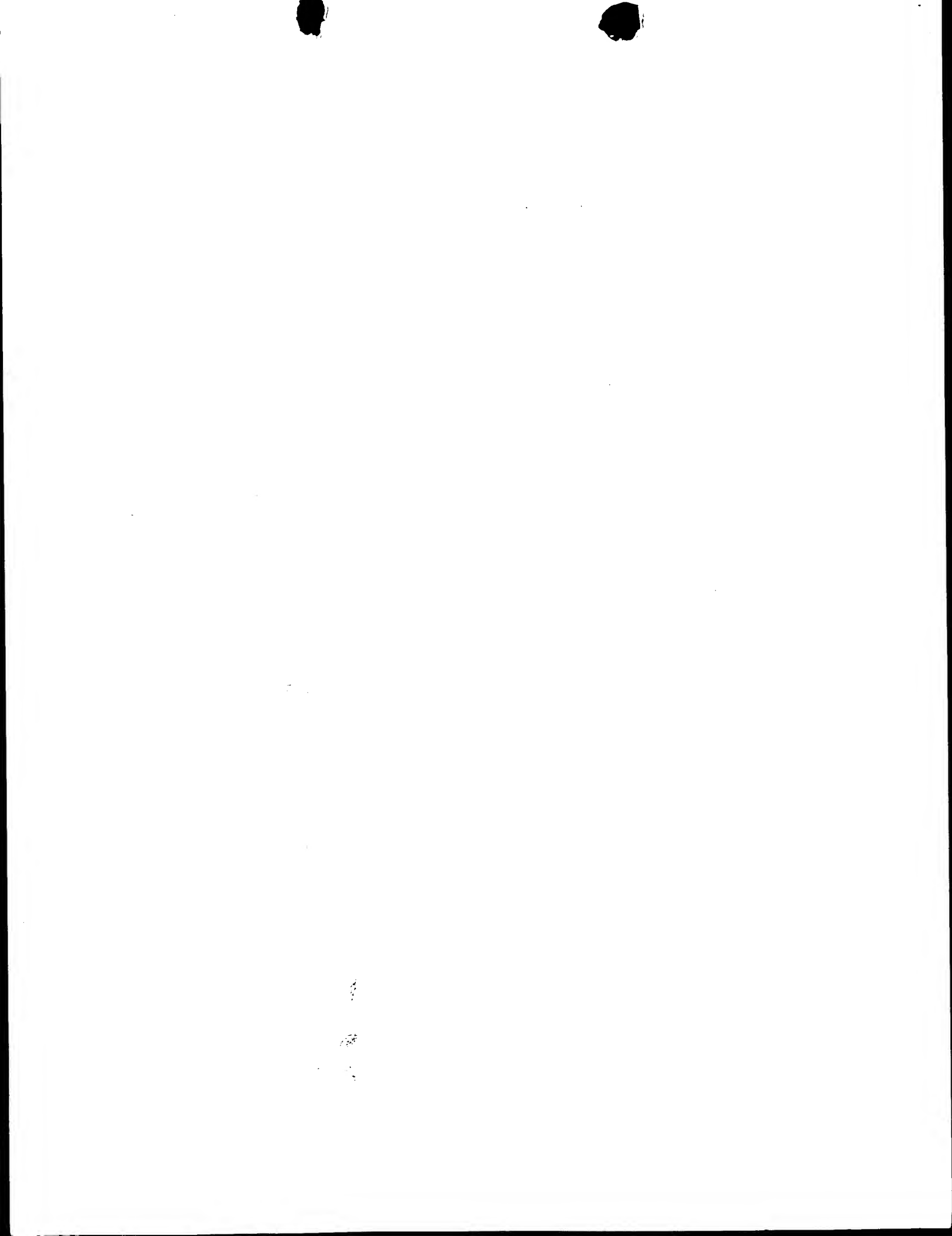
図面の浄書 (内容に変更なし)

補正命令通知の日付 昭和57年2月4日

~~補正により増加する発明の数~~

57. 3. 5

出願第156335号



## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—141194

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 9/96  
C 12 Q 1/00

識別記号

庁内整理番号  
7421—4B  
7349—4B

⑬ 公開 昭和55年(1980)11月4日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全14頁)

## ⑭ 酵素標準組成物

⑯ 特 願 昭55—26779

⑰ 出 願 昭55(1980)3月5日

優先権主張 ⑱ 1979年3月5日 ⑲ 米国(US)

⑳ 17871

㉑ 1980年1月21日 ㉒ 米国(US)

㉓ 114009

㉔ 発 明 者 アラン・エル・ラウダーバック  
アメリカ合衆国カリフォルニア

州テンブル・シティ・ロングデ  
ン・アベニュー9661

㉕ 出 願 人 ベックマン・インストルメンツ  
・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国カリフォルニア  
州フラートン・ハーバー・ブー  
ルバード2500

㉖ 代 理 人 弁護士 ウォーレン・ジー・シ  
ミオール

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

酵素標準組成物

## 2. 特許請求の範囲

1. (a) 少なくとも一種の既知値の酵素成分；  
(b) 20～40重量%の、2～5個の炭素原子を有する少なくとも一種のアルキレンポリオール；  
(c) 1デシリットル当り3～8グラムの、人間血清アルブミンマトリックス中に存在する全タンパク質；  
(d) 60～80重量%の水；  
からなる酵素標準組成物。
2. 5.8～8.7のpHを有する特許請求の範囲第1項記載の組成物。
3. 6～8.5のpHを有する特許請求の範囲第1項記載の組成物。
4. 6～7のpHを有する特許請求の範囲第1項記載の組成物。
5. 6.4～6.6のpHを有する特許請求の範囲

(1)

第1項記載の組成物。

6. 30～34重量%の前記アルキレンポリオールと、1デシリットル当り4～5グラムの全タンパク質と、66～70重量%の水とを含む特許請求の範囲第1～4項のうちの任意のものまたは第5項記載の組成物。
7. 前記酵素の少なくとも一種が、酸性ホスファターゼ、アルドラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アミラーゼ、コリンエステラーゼ、クレアチンキナーゼ、α-グルタミルトランスペプチダーゼ、α-オキシ酪酸脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、ロイシンアミノペプチダーゼ、リパーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼからなるグループから選択されている特許請求の範囲第1～4項のうちの任意のものまたは第5項記載の組成物。
8. 前記酵素の一部が酸性ホスファターゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アミラーゼ、ク

(2)





レアチンキナーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスベプチダーゼ、および乳酸脱水素酵素からなる特許請求の範囲第1~4項のうちの任意のものまたは第5項記載の組成物。

9. (a) 1リットル当り約0~350国際単位のアルカリ性ホスファターゼ；
  - (b) 1リットル当り約0~20国際単位の酸性ホスファターゼ；
  - (c) 1リットル当り約0~400国際単位のアミラーゼ；
  - (d) 1リットル当り約0~600国際単位のクレアチンキナーゼ；
  - (e) 1リットル当り約0~200国際単位のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ；
  - (f) 1リットル当り約0~200国際単位のアラニンアミノトランスフェラーゼ；
  - (g) 1リットル当り約0~300国際単位のア-グルタミルトランスベプチダーゼ；
- (3)

のアラニンアミノトランスフェラーゼ；

- (g) 1リットル当り約0~300国際単位のア-グルタミルトランスベプチダーゼ；

(h) 1リットル当り約0~500国際単位  
の乳酸脱水素酵素；

(i) 1リットル当り125~157ミリ当  
量のナトリウム；

(j) 1リットル当り3.5~4.5ミリ当量の  
カリウム；

(k) 1センチリットル当り8.4~10.6ミリ  
グラムのカルシウム；

(l) 1センチリットル当り16~24ミリグ  
ラムのリン；

(m) 1センチリットル当り16~24ミリグ  
ラムのマグネシウム；

(n) 1リットル当り88~112ミリ当量  
の塩化物；

からなり、酵素活性が37℃で決められると  
ころの特許請求の範囲第1~4項のうちの任  
意のものまたは第5項記載の組成物。

(5)

(h) 1リットル当り約0~500国際単位  
の乳酸脱水素酵素；

からなり、酵素活性が37℃で決められると  
ころの特許請求の範囲第1~4項のうちの任  
意のものまたは第5項記載の組成物。

10. ナトリウム、カリウム、カルシウム、リン、  
およびマグネシウムをさらに含む特許請求の  
範囲第1~4項のうちの任意のものまたは第  
5項記載の組成物。

11. (a) 1リットル当り約0~350国際単位  
のアルカリ性ホスファターゼ；

(b) 1リットル当り約0~20国際単位の  
酸性ホスファターゼ；

(c) 1リットル当り約0~400国際単位  
のアミラーゼ；

(d) 1リットル当り約0~600国際単位  
のクレアチンキナーゼ；

(e) 1リットル当り約0~200国際単位  
のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ；

(f) 1リットル当り約0~200国際単位  
(4)

12. (a) 1リットル当り約0~350国際単位  
のアルカリ性ホスファターゼ；

(b) 1リットル当り約0~20国際単位の  
酸性ホスファターゼ；

(c) 1リットル当り約0~400国際単位  
のアミラーゼ；

(d) 1リットル当り約0~600国際単位  
のクレアチンキナーゼ；

(e) 1リットル当り約0~200国際単位  
のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ；

(f) 1リットル当り約0~200国際単位  
のアラニンアミノトランスフェラーゼ；

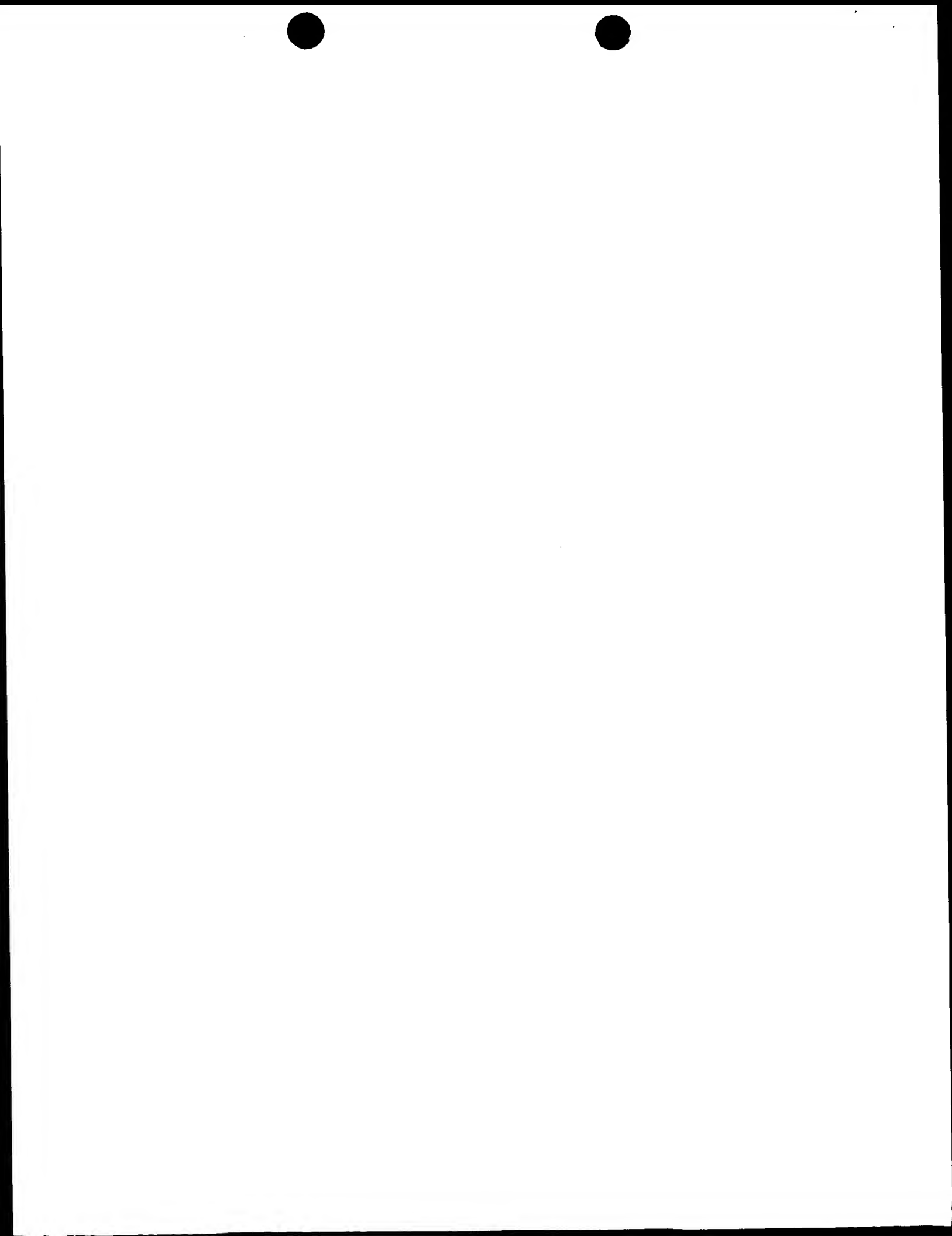
(g) 1リットル当り約0~300国際単位  
のア-グルタミルトランスベプチダーゼ；

(h) 1リットル当り約0~500国際単位  
の乳酸脱水素酵素；

(i) 1リットル当り125~157ミリ当  
量のナトリウム；

(j) 1リットル当り3.5~4.5ミリ当量の  
カリウム；

(6)



(k) 1デシリットル当り8.4~10.6ミリ  
グラムのカルシウム；

(l) 1デシリットル当り1.6~2.4ミリグ  
ラムのリン；

(m) 1デシリットル当り1.6~2.4ミリグ  
ラムのマグネシウム；

(n) 1リットル当り88~112ミリ当量  
の塩化物；

からなり、酵素活性が37℃で決められかつ  
前記酸性ホスファターゼが人間精液から誘導  
され、前記アルカリ性ホスファターゼが子牛  
腸から誘導され、前記アミラーゼが豚すい臓  
から誘導され、前記クレアチンキナーゼが猪  
筋肉から誘導され、前記アスパラギン酸アミ  
ノトランスフェラーゼおよびアラニンアミ  
ノトランスフェラーゼが豚心臓から誘導され、  
前記乳酸脱水素酵素が鶏心臓から誘導されて  
いるところの特許請求の範囲第1~4項のう  
ちの任意のものまたは第5項記載の組成物。

(7)

は重炭酸塩とからなる凍結乾燥照合標準が開示さ  
れている。トリス炭酸塩は血清に正常なpHを付  
与し、それによりその成分特に酵素の安定性が得  
られる。(日常条件の下で収集される正常な血清  
および血漿では、正常なpH範囲は約7.3~約  
7.45であると一般に見なされている。ペンシル  
バニア州フィラデルフィア、W. B. Saunders  
Co. 発行(1970)、Tietz 著、Fundamental  
of Clinical Chemistry, p. 634 およびニュ  
ーヨーク州ニューヨーク、Harper & Row 発行  
(1974)、Henry 著、Clinical Chemistry,  
Principles and Technics, 第二版, pp.  
774-778, 参照)。

米国特許第3876375号および第4121905  
号(以後モウルカス(Maurukas)Iおよびモウル  
カスIIとして参照する)には、生物学的比較対照  
組成物が開示されており、その非生物化合物は約  
60~約80重量%の水と約20~約40重量%  
の、2乃至5個の炭素原子を有する少なくとも一  
種のアルキレンポリオールとからなり、残部は主

(9)

### 3. 発明の詳細な説明

この発明は実験室用物質に関し、さらに詳述す  
れば、安定な酵素標準組成物に係るものである。

計器を校正するためまたは計器が所望の許容差  
内でなお動作しつつあることを周期的に確認する  
ために酵素の分析に関連して使用されうる種々の  
組成物は当業者には知られている。

たとえば、米国特許第3466249号(以後  
アンダーソン(Anderson)として参照する)には、  
凍結乾燥血清の第一の容器と、重炭酸アンモニウ  
ム水溶液の第二の容器とからなる血清照合標準が  
開示されている。アンダーソンの再構成血清の最  
終pHは7.5±0.5である。このpH範囲はアン  
ダーソンでは試験系に対しならびに再構成血清成  
分特に酵素の安定性に対して許容範囲内にあるも  
のと感じられる。

米国特許第3629142号(以後マルバツハ  
(Marbach)として参照する)には、蒸留水の添  
加によつて再構成されるところの、血清とトリス  
(ヒドロキシメチル)アミノメタンの炭酸塩また

(8)

として血清、酵素、代謝物質、電解質およびホル  
モンからなるグループから選択された少なくとも一  
種の天然生物物質である。この組成物のpHは  
モウルカスIまたはモウルカスIIに開示されてい  
ないが、実験によればpHは約8.3~約8.5であ  
る。

上記先行技術組成物の一欠点はそれらの酵素成  
分がきわめて不安定であることである。たとえば、  
マルバツハの範囲内にあるものと信じられる市販  
組成物の製造業者は、蒸留水または脱イオン水再  
構成血清の酵素成分の定量は血清が再構成される  
日においてのみ行なわれるべきことを推奨してい  
る。

同様に、アンダーソンの範囲内にある市販組成  
物の製造業者もまた、その再構成組成物の定量は  
血清が再構成される日においてのみ行なわれるべ  
きことを推奨している。

上記両再構成組成物は2~8℃の温度で貯蔵さ  
れるべきであると製造業者により推奨されている。

本発明は改良された貯蔵寿命を有する酵素標準

(10)



組成物を包含する。この組成物は、少なくとも一種の既知値の酵素と、約20～約40重量%の、2乃至5個の炭素原子を有する少なくとも一種のアルキレンポリオールと、約3～約8  $\mu\text{m/dL}$ の、人間血清アルブミンマトリックス中に存在する全タンパク質と、約60～約80重量%の水とからなる。

この発明の範囲内の組成物の酵素成分は、アレニウスプロット (Arrhenius Plot) を基準として、第I表に示す期間それらの初値の90%を保持する。

第 I 表  
90%寿命に対するアレニウスプロット  
貯蔵温度 4℃

酵素構成	貯蔵寿命
アミラーゼ	6.8年
$\gamma$ -グルタミルトランスベプチダーゼ	20.6.9年
乳酸脱水素酵素	1.0年
クレアチンキナーゼ	14.5.9年
アルカリ性ホスファターゼ	9.9月
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	2.4年
アラニンアミノトランスフェラーゼ	6.6年

(11)

(SGOT; AST; GOT; グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)がある。

酵素標準組成物中に存在する各酵素の活性は重要でない。好適には、各酵素の活性は正常および異常値を包含する範囲内にあるべきである。

各酵素の酵素もまた重要でない。しかしながら、いくつかの酵素の好適酵素は第II表に示されている。

第 II 表

酵素成分	好適源
ACP	人間精液
ALP	子牛腸
アミラーゼ	豚すい臓
CK	猿筋肉
SGOT	豚心臓
SGPT	豚心臓
$\gamma$ -GT	豚腸
LDH	鶏心臓

本発明の酵素標準組成物はまた約20～約40重量%の、2～5個の炭素原子を有する少なくと

(13)

上記アレニウスプロットは、この発明の範囲内の酵素標準組成物の酵素成分が先行技術の標準組成物中に存在する酵素成分の貯蔵寿命をはるかに超える期間安定であることを示すものである。

本発明の酵素標準組成物は少なくとも一種の既知値の酵素成分を含む。臨床上有意の任意の酵素がその中に存在しうる。現在臨床実験室で分析される典型的酵素には、酸性ホスファターゼ (ACP)、アルドラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、アミラーゼ、コリンエステラーゼ、クレアチンキナーゼ (CK; クレアチンホスフォキナーゼ (CPK) としても知られている)、 $\alpha$ -グルタミルトランスベプチダーゼ ( $\gamma$ -GT; GOT)、 $\alpha$ -オキシ酪酸脱水素酵素 ( $\alpha$ -HBD; HBD)、イソクエン酸脱水素酵素 (ICD)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、ロイシンアミノベプチダーゼ (LAP)、リパーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ (SGPT; ALT; GPT; グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ)、およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

(12)

も一種のアルキレンポリオールを含む。好適には、アルキレンポリオールは酵素標準組成物の約30～約34重量%を構成する。

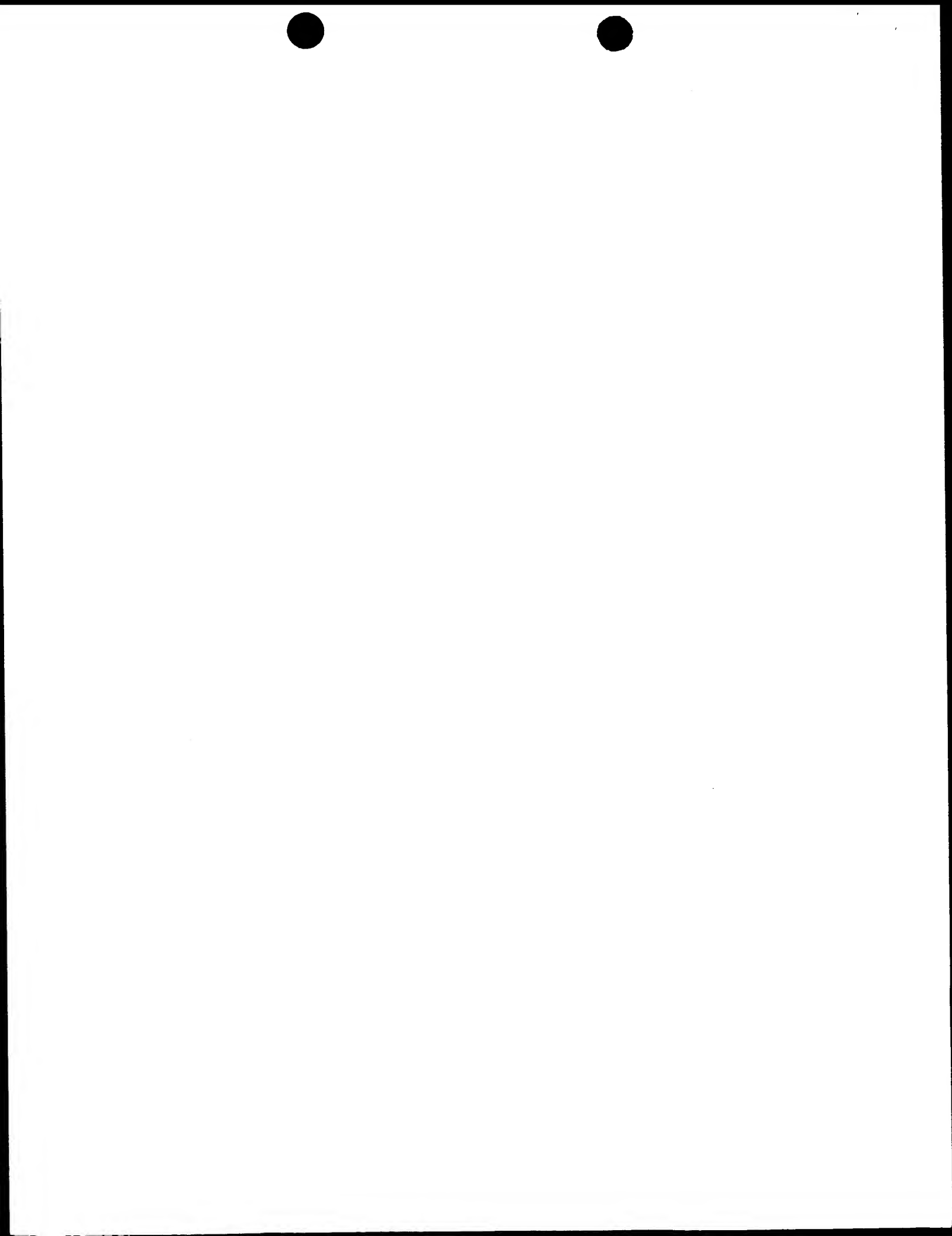
使用できる適当なアルキレンポリオールには、例として、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、ペンタンジオール、グリセロールがある。アルキレンポリオール物質は好適にはエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロールおよびこれらの混合物からなるグループから選択される。

本発明の酵素標準組成物はまた約3～約8  $\mu\text{m/dL}$ の全タンパク質を含む。好適には、約4～約5  $\mu\text{m/dL}$ の全タンパク質が酵素標準組成物中に存在する。全タンパク質は人間血清アルブミンマトリックス中に存在する。

本発明の酵素標準組成物はまた約60～約80重量%の水を含む。好適には、水は酵素標準組成物の約66～約70重量%を構成する。

水は人間血清アルブミン物質の一部であることができおよび/または別個の成分として添加する

(14)



ことができる。

本発明の酵素標準組成物のpHは重要でない。酵素標準組成物の最適pHはその中に存在する特定酵素に依存して変化する。一般に、pHは約5.0～約8.7でありうる。好適には、pHは約6～約8.5であり、さらに好適には、pHは約6～約7である。通常、好適pHは約6.4～約6.6である。しかしながら、ACPは約6.0の随意的pHを有する。

pHは当業者が使用する任意の便宜な手段により、たとえば、塩酸(HCl)または水酸化ナトリウム(NaOH)を組成物に添加することにより調整することができる。

本発明の酵素標準組成物はまたさらに既知値の代謝物質、電解質およびホルモンを含むことができる。好適には、本発明の酵素標準組成物はさらに臨床化学者に関心のある量のナトリウム、カリウム、カルシウム、リン、マグネシウムおよび塩化物を含む。

本発明の酵素標準組成物はガラスアンプルのよ  
(15)

素に対する最適レベルに再調整される。

本発明の安定な酵素標準組成物は酵素照合標準としてまたは酵素比較対照として使用することができる。すなわち、この組成物は計器を校正するために使用することができまたは計器が所望の許容差内でなお動作しつつあることを周期的に確認するために使用することができる。上記用途のために、本発明の酵素標準組成物は臨床実験室の者に関心のある典型的な量の少なくとも一種の酵素を含むことができる。

以下の実施例は本発明をさらに例示する目的で提供され、本発明の制限を意図したものではない。

#### 実 施 例 1

第Ⅱ表は本発明の酵素標準組成物の一好適実施例を示し、酵素活性は37℃で測定される。

(17)

うな任意の適当な容器中に貯蔵することができる。

一般に、本発明の酵素組成物は下記の手順によつて調製することができる。所望割合のアルブミンを有する溶液が適切な量のアルブミンを蒸留水または脱イオン水に溶解することによつて作られる。ついで、このアルブミン溶液に2～5個の炭素原子を有する少なくとも一種のアルキレンポリオール-アルブミン溶液が約20～約40重量%のアルキレンポリオールと、約60～約80重量%の水と、人間血清アルブミンマトリックス中約3～約8g/dLの全タンパク質とから構成されるようにする。ついで、アルキレンポリオール-アルブミン溶液のpHが所望レベルに調整される。pH調整後、アルキレンポリオール-アルブミン溶液は溶液の所望成分のおのののに対する基線値を得るために酵素活性と塩含量について分析される。ついで、ある量の各成分が溶液に添加され、所望量の酵素と塩が存在するようにする。

必要ならば、ついで、溶液のpHが存在する酵  
(16)

第 Ⅱ 表

試 験	規 格
ACP	0-20IU/L
ALP	0-350IU/L
アミラーゼ	0-400IU/L
CK	0-600IU/L
SGOT	0-200IU/L
SGPT	0-200IU/L
γ-GT	0-300IU/L
LDH	0-500IU/L
ナトリウム	125-157mEq/L
カリウム	3.5-4.5mEq/L
カルシウム	8.4-10.6mg/dL
リン	1.6-2.4mg/dL
マグネシウム	1.6-2.4mg/dL
塩化物	88-112mEq/L
pH	6.5±0.1
HBsAg-B*	負
全タンパク質(人間アルブミン)	4.5±0.5g/dL
エチレングリコール	33%重量%
水	66%重量%

\* HBsAg-B は肝炎-表面抗原型Bを示す。

(18)





アルブミン基酵素標準組成物の調製

アルブミン（人間 Cohn Fraction V）をエチレングリコールの 30% 重量% 水溶液に絶えず混合しながらゆつくり添加する。アルブミンは好適には室温で溶解されるが、2～8℃における延長した混合も許容される。添加されるアルブミンの量は全タンパク質含量が約  $4.5 \pm 0.5 \text{ g/ml}$  になるように調整される。

得られた溶液の pH は、必要ならば、6 N HCl または 6 N NaOH で  $6.5 \pm 0.1$  に調整される。

次に、0.4～0.6 μ の最終フィルター多孔度を有するエチレングリコール不透過性フィルター物質で溶液をろ過する。

ろ過した溶液を組成物の各成分に対する基線値を得るために酵素活性と塩含量について分析する。ある量の各成分を添加して酵素および塩が前記第 II 表に示したレベル内の量で存在するようにする。

必要ならば、酵素標準組成物の pH を 6 N HCl または 6 N NaOH で  $6.5 \pm 0.1$  に再調整する。

(19)

第 IV 表

ALP

時間	41℃		37℃		32℃		25℃		-15℃	
	A	$\frac{A \times 100\%}{E}$	B	$\frac{B \times 100\%}{E}$	C	$\frac{C \times 100\%}{E}$	D	$\frac{D \times 100\%}{E}$	E	
00	4450	100	4450	100	4450	100	4450	100	4450	
40	4620	104	4490	101	4550	102	4480	101	4450	
80	4710	100	4740	101	4790	102	4640	99	4700	
240	4330	94	4450	96	4600	100	4830	105	4620	
480	4150	89	4260	92	4480	97	4630	100	4640	
720	4000	86	4320	93	4440	95	4630	99	4660	
960	3820	84	4150	91	4350	95	4600	101	4570	
1200	3910	85	4310	94	4450	97	4540	99	4600	
1440	3720	82	4090	90	4200	93	4530	100	4540	
3120	3220	69	3750	80	4150	88	4440	95	4690	
4800	2810	60	3530	75	3980	85	4260	90	4710	
6480	2640	58	3260	72	3780	84	4170	92	4520	

(21)

本発明の範囲内の酵素標準組成物のロードが実施例 2 に示した手順に従って調製され、プラスチックびん中に貯蔵された。これらの組成物は種々の温度（-15℃、25℃、32℃、37℃、41℃）で温置され、指定された時間間隔で 37℃ で分析された。得られたデータは第 V-X 表に示されている。

第 X 表は第 V-X 表に示したデータに基づいた 90% 寿命に対するアレニウスプロットを示す。

(20)

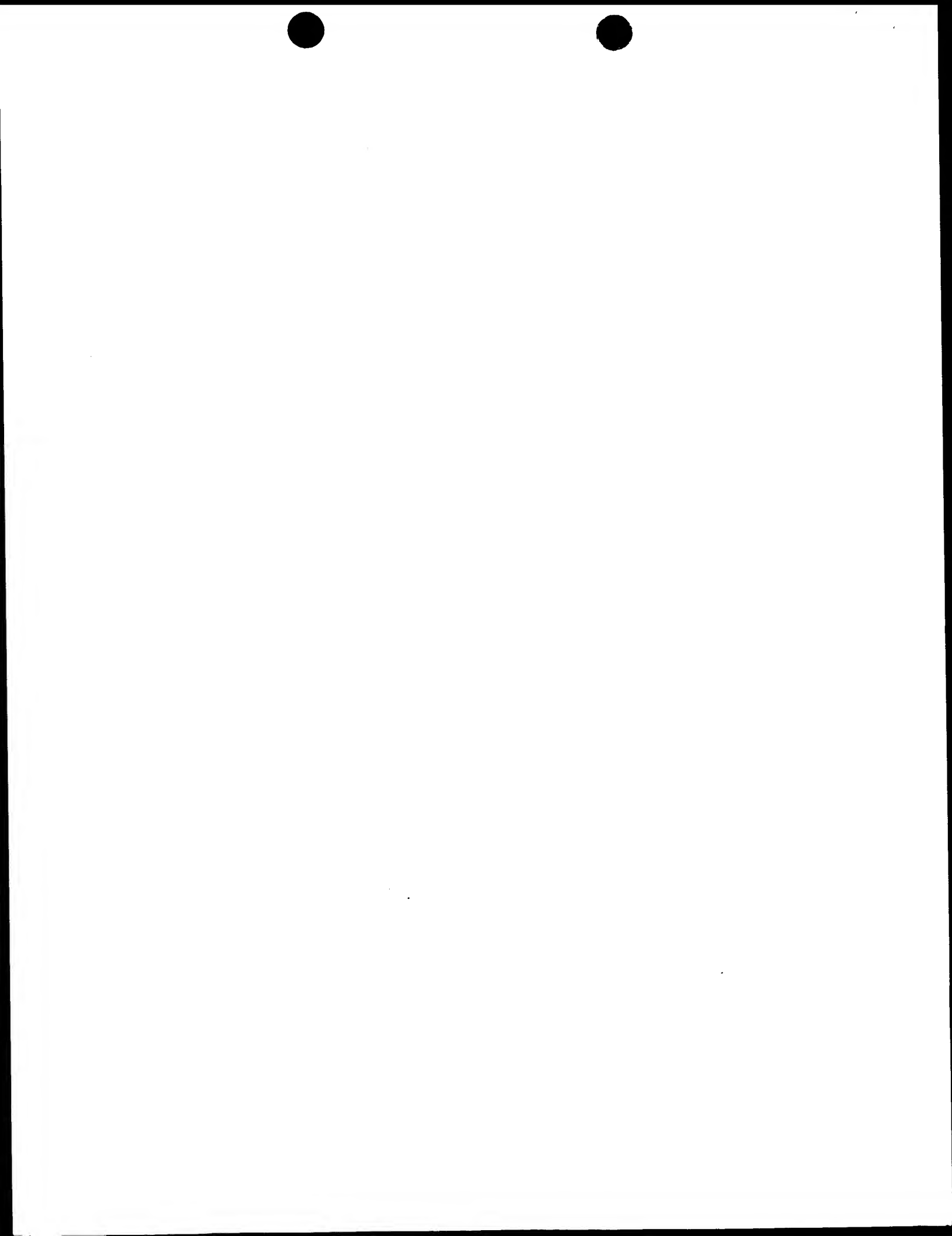
第 V 表

アミラーゼ

時間	41℃		37℃		32℃		25℃		-15℃	
	A	$\frac{A \times 100\%}{E}$	B	$\frac{B \times 100\%}{E}$	C	$\frac{C \times 100\%}{E}$	D	$\frac{D \times 100\%}{E}$	E	
00	4200	100	4200	100	4200	100	4200	100	4200	
40	4120	98	4050	96	4020	96	4120	98	4200	
80	3800	95	3970	100	3970	100	3820	96	3980	
240	3610	95	3680	96	3680	96	3810	100	3820	
480	3620	91	3720	94	3810	96	3790	95	3970	
720	3540	89	3730	94	3910	98	--N/A--		3970	
960	3190	86	3570	96	3690	99	--N/A--		3710	
1200	3290	84	--N/A--		3770	96	3860	99	3910	
3120	2950	75	3770	96	3890	99	3940	101	3920	
4800	2910	74	3750	95	4070	103	3820	97	3940	
6480	3060	75	3810	94	4080	100	4140	102	4060	

(22)

1. N/A は利用できないことを示す。



第 Ⅷ 表

SGPT

時間	41℃		37℃		32℃		25℃		-15℃
	A	$\frac{A}{E} \times 100\%$	B	$\frac{B}{E} \times 100\%$	C	$\frac{C}{E} \times 100\%$	D	$\frac{D}{E} \times 100\%$	E
00	5220	100	5220	100	5220	100	5220	100	5220
40	5030	98	5170	99	5170	99	5190	99	5220
80	4730	91	4780	92	4930	95	5110	98	5210
240	4380	84	4750	91	4880	94	5110	98	5210
480	4180	78	4580	86	4880	92	5140	96	5330
720	3630	74	4180	84	4660	94	--N/A--	--	4960
960	3570	68	4180	80	4740	90	5080	97	5250
1200	3230	66	4110	83	4530	91	4870	98	4970

1 N/Aは利用できないことを示す。

(25)

第 Ⅷ 表

CK

時間	41℃		37℃		32℃		25℃		-15℃
	A	$\frac{A}{E} \times 100\%$	B	$\frac{B}{E} \times 100\%$	C	$\frac{C}{E} \times 100\%$	D	$\frac{D}{E} \times 100\%$	E
00	5530	100	5530	100	5530	100	5930	100	5590
40	5430	97	5510	99	5580	100	5330	99	5590
80	5130	93	5440	98	5500	99	5590	100	5540
240	4170	75	5140	92	5440	98	5490	99	5570
480	3000	54	4740	86	5290	95	5540	100	5540
720	2070	38	4500	83	5170	95	5240	97	5430
960	--N/A--	--	4100	76	4990	93	5340	99	5390
1200	--N/A--	--	4080	73	5190	92	5270	94	5620
1440	--N/A--	--	3720	68	5070	92	5520	100	5510
5120	--N/A--	--	2590	46	4760	85	5430	97	5530
4800	--N/A--	--	--N/A--	--	4450	80	5380	96	5580
6480	--N/A--	--	--N/A--	--	4130	74	5030	90	5580

1 N/Aは利用できないことを示す。

第 Ⅷ 表

7-GT

時間	41℃		37℃		32℃		25℃		-15℃
	A	$\frac{A}{E} \times 100\%$	B	$\frac{B}{E} \times 100\%$	C	$\frac{C}{E} \times 100\%$	D	$\frac{D}{E} \times 100\%$	E
00	1390	100	1390	100	1390	100	1390	100	1390
40	1390	100	1360	98	1390	100	1430	103	1390
80	1380	101	1400	102	1370	100	1390	101	1370
240	1330	96	1370	99	1330	96	1390	101	1380
480	1350	98	1360	99	1380	100	1380	100	1380
720	1350	96	1430	101	1430	101	1400	99	1410
960	1360	97	1420	101	1420	101	1420	101	1410
1200	1420	96	1480	100	1460	99	1430	97	1480
1440	1370	98	1410	101	1390	99	1440	103	1400
3120	1290	91	1350	96	1390	99	1410	100	1410
4800	1240	91	1330	97	1360	99	1370	100	1370
6480	1210	89	1320	97	1360	100	1360	100	1360

(26)

特選55-141194(7)

第 Ⅷ 表

SGOT

時間	41℃		37℃		32℃		25℃		-15℃
	A	$\frac{A}{E} \times 100\%$	B	$\frac{B}{E} \times 100\%$	C	$\frac{C}{E} \times 100\%$	D	$\frac{D}{E} \times 100\%$	E
00	4640	100	4640	100	4640	100	4640	100	4640
40	4630	100	4580	99	4670	101	4600	99	4640
80	4540	99	4530	100	4580	100	4620	100	4600
240	4390	96	4430	98	4540	99	4530	99	4570
480	4210	92	4350	95	4490	98	4590	100	4600
720	4180	88	4560	96	4660	98	4670	99	4740
960	3890	82	4280	90	4510	95	4720	100	4740
1200	3680	79	4130	89	4390	94	4480	96	4660
1440	3470	75	3950	85	4260	92	4550	98	4620
3120	2380	51	3210	69	3880	83	4390	94	4660
4800	1530	33	2340	55	3460	74	4230	91	4650
6480	--N/A--	--	2900	45	3130	68	4080	88	4620

1 N/Aは利用できないことを示す。



第 X 表

時 間	LDH					LDH				
	41°C	37°C	32°C	25°C	-15°C	41°C	37°C	32°C	25°C	-15°C
	A $\frac{A \times 100\%}{E}$	B $\frac{B \times 100\%}{E}$	C $\frac{C \times 100\%}{E}$	D $\frac{D \times 100\%}{E}$	E	A $\frac{A \times 100\%}{E}$	B $\frac{B \times 100\%}{E}$	C $\frac{C \times 100\%}{E}$	D $\frac{D \times 100\%}{E}$	E
00	6620	100	6620	100	6620	6620	100	6620	100	6620
40	6520	98	6550	99	6510	6510	98	6510	98	6620
80	6170	97	6230	98	6260	6260	99	6260	100	6320
240	5910	94	6030	96	6090	6090	97	6090	99	6270
480	5850	94	6040	97	6030	6030	98	6080	98	6210
720	5550	92	5560	93	5840	5840	97	5900	98	6010
960	5630	90	5850	95	5970	5970	96	6120	99	6190
1200	5530	89	5720	92	5930	5930	96	6010	97	6190

(27)

第 V-X 表ならびにこれに基づいた第 X 表のアレニウスプロットのデータは、この発明の範囲内の酵素標準組成物が先行技術標準組成物中に存在する酵素成分の貯蔵寿命をはるかに超える時間にわたって安定であることを示している。

以下の実施例は本発明とモウルカス I およびモウルカス II に示された発明との顕著な差異を示す目的で提供される。

## 実 施 例 4

本発明の範囲内の酵素標準組成物の多数のロットが実施例 2 に示した手順に従って調製された。ただし、特定ロットの pH が  $6.5 \pm 0.1$  以外である場合には、そのロットの pH は 6 N HCl または 6 N NaOH で調整された。これらのロットはプラスチックびん中に貯蔵され、各種の温度で温置され、指定された時間間隔で 37°C で分析された。得られたデータは第 XX-XX 表に示されている。

(29)

第 XI 表

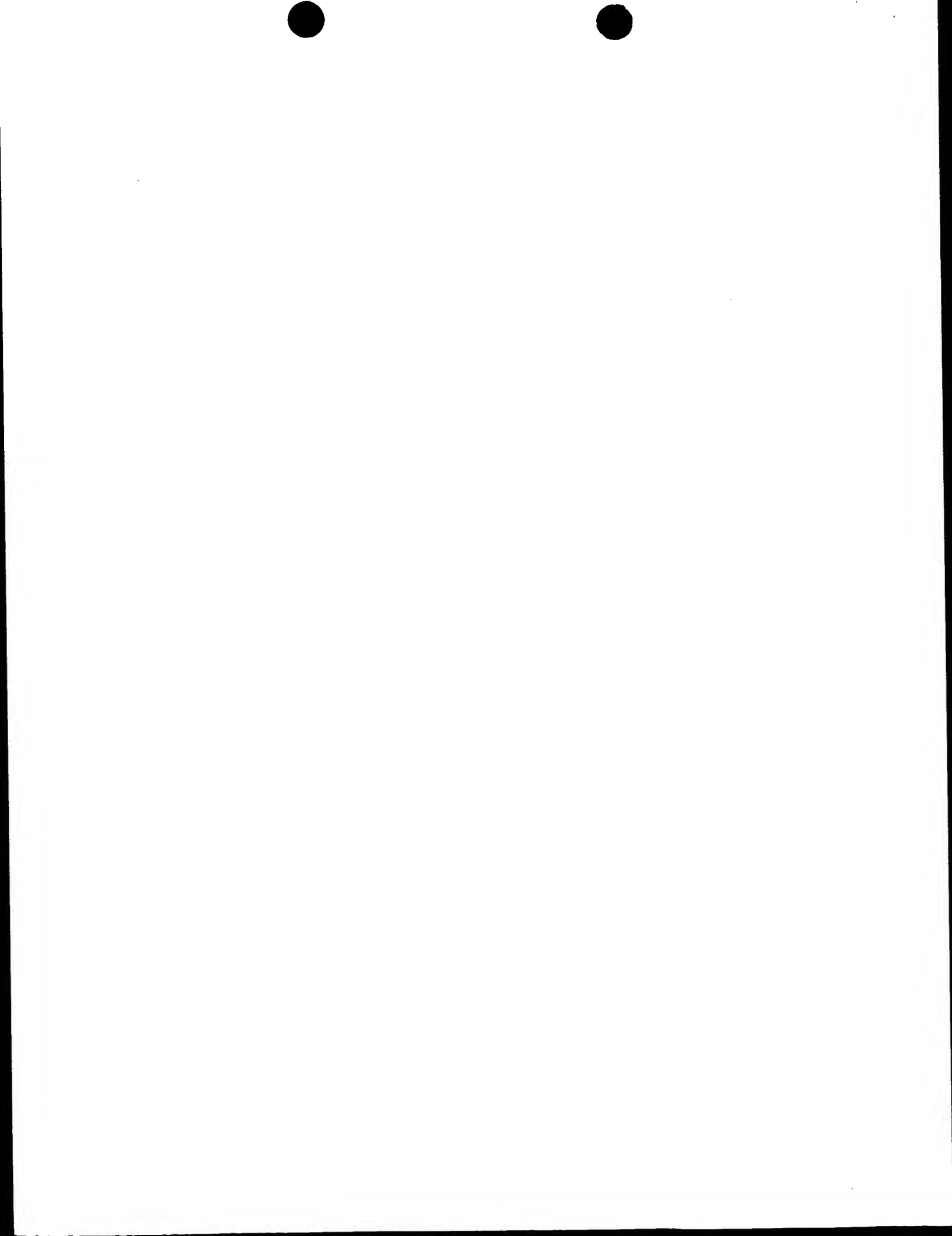
ALP: 人間血清アブミンマトリックス中 pH 6.5

温度 41°C, 37°C, 32°C, 25°C に基づいた  
90% 寿命に対するアレニウスプロット

時間	41℃		37℃		32℃		25℃		-15℃	
	A	$\frac{A}{E} \times 100\%$	B	$\frac{B}{E} \times 100\%$	C	$\frac{C}{E} \times 100\%$	D	$\frac{D}{E} \times 100\%$	E	
00	1070	100	1070	100	1070	100	1070	100	1070	
40	1100	103	1670	156	1090	102	1080	100	1070	
80	1130	97	1150	99	1150	99	1120	96	1160	
240	1030	96	1060	99	1090	102	1070	100	1070	
480	1010	89	1060	93	1070	94	1100	96	1140	
720	980	89	1030	94	1080	98	1120	102	1100	
960	940	84	1000	89	1040	93	1100	98	1120	
1200	950	81	1040	89	1050	90	1060	91	1170	
1440	880	78	990	88	1020	90	1090	96	1130	
3120	780	68	940	82	1000	88	1080	95	1140	
4800	700	64	850	77	940	85	1030	94	1100	
6480	660	60	770	70	890	81	970	88	1100	

(30)

特開昭55-141194(8)



第 XV 表

CK: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 8.5

時 間	31°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	
0.0	4640	100	4640	100	4640	100	4640	
4.0	4400	95	4810	104	4510	97	4640	
8.0	3150	65	4250	88	5070	105	4850	
24.0	620	13	5030	65	4150	89	4660	
48.0	--N/A--	--	2030	43	3930	81	4850	
72.0	--N/A--	--	--N/A--	--	--N/A--	--	4850	
96.0	--N/A--	--	--N/A--	--	3170	70	4500	
168.0	--N/A--	--	--N/A--	--	4450	92	4820	
336.0	--N/A--	--	--N/A--	--	2010	43	4650	

(33)

N/Aは利用できないことを示す。

-511-

第 XII 表

ALP: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 8.5

時 間	31°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	
0.0	6860	100	6860	100	6860	100	6860	
4.0	7190	105	6720	98	6790	99	6860	
8.0	7440	99	7270	96	8260	109	7550	
72.0	7400	98	7870	104	7880	104	7550	
96.0	7540	97	8220	106	8010	103	7440	
168.0	--N/A--	--	7440	99	--N/A--	--	7480	

(31)

N/Aは利用できないことを示す。

第 XV 表

SOOT: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 6.0

時 間	31°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	E
0.0	1940	100	1940	100	1940	100	1940	
24.0	1870	96	1820	97	1910	98	1920	99
48.0	1790	92	1860	96	1910	98	1900	98
168.0	1530	79	1690	87	1780	92	1860	96

(33)

第 XV 表

CK: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 6.5

時 間	31°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{E} \times 100\%$	B	$\frac{B}{E} \times 100\%$	C	$\frac{C}{E} \times 100\%$	D	E
0.0	3400	100	3400	100	3400	100	3400	
4.0	3300	97	3250	96	3350	99	3320	98
8.0	3099	93	3100	93	3350	101	3370	101
24.0	2490	75	3050	91	3220	96	3310	99
48.0	1840	55	2850	85	3160	94	3300	99
72.0	1300	39	2680	80	3120	94	3210	96
96.0	--N/A--	--	2480	76	2980	92	3190	98
120.0	--N/A--	--	2450	72	3120	91	3240	95
144.0	--N/A--	--	2310	70	3030	91	3280	99

(33)

N/Aは利用できないことを示す。

特開昭55-141194(9)





第 XX 表

SGPT: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 8.5

時間	41°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	
0.0	2550	100	2550	100	2550	100	2550	
4.0	2500	98	2320	91	2460	96	2550	
8.0	2180	94	2160	94	2460	106	2310	
24.0	1910	79	2150	89	2220	92	2410	
48.0	1500	70	1930	91	2180	102	2130	
72.0	1400	56	2010	80	2270	91	2500	
96.0	1070	46	1750	75	2060	88	2340	
168.0	--N/A--	--	1400	63	2090	95	2210	
336.0	--N/A--	--	290	14	750	35	2130	

(37)

N/Aは利用できないことを示す。

-512-

第 XX 表

LDH: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 6.5

時間	41°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	
0.0	4160	100	4160	100	4160	100	4160	
4.2	4020	97	4070	98	4100	99	4160	
8.0	4070	104	4080	104	4100	105	3920	
24.0	4470	112	4920	123	4830	121	4090	
48.0	3780	92	3940	96	3940	96	4110	
72.0	4200	91	4320	94	4600	100	4610	
96.0	3460	83	3780	93	3960	98	4060	
168.0	3810	85	--N/A--	--	4170	93	4470	
336.0	3430	83	3700	90	3770	92	4110	
505.0	3600	84	3720	87	3940	92	4270	

(38)

N/Aは利用できないことを示す。

第 XV 表

SGOT: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 8.5

時間	41°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	
0.0	2880	100	2880	100	2880	100	2880	
4.0	2890	100	2790	97	2760	96	2880	
8.0	2730	98	2720	98	2860	103	2780	
24.0	3010	99	3040	100	2980	98	3050	
48.0	2860	99	2880	99	2440	84	2900	
72.0	2910	98	2900	97	2930	98	2980	
96.0	2940	98	2950	99	2940	98	2990	
168.0	--N/A--	--	3000	99	2460	81	3040	
336.0	--N/A--	--	2710	93	2800	96	2920	

(35)

N/Aは利用できないことを示す。

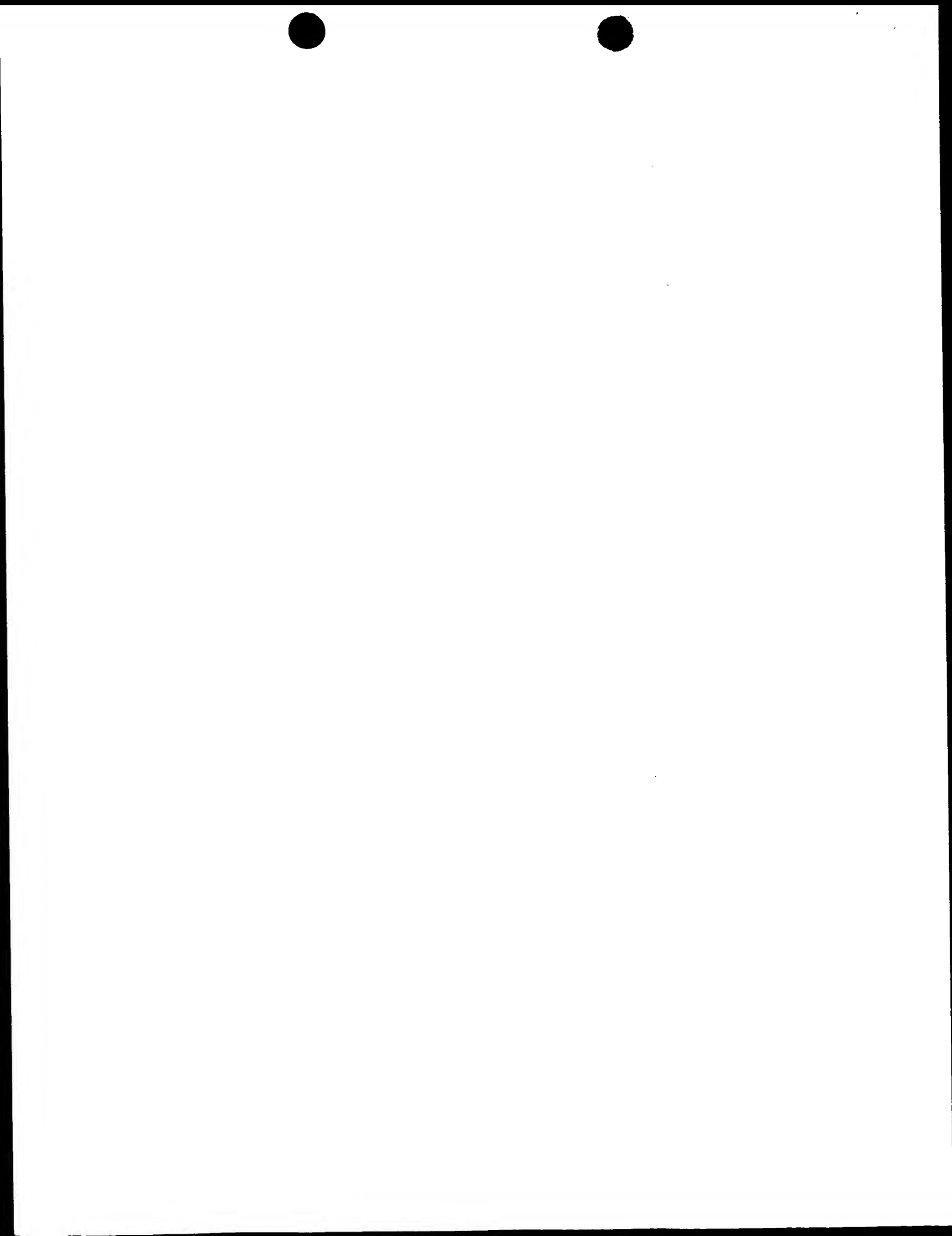
第 XV 表

SGPT: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 6.0

時間	41°C		37°C		32°C		25°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	$\frac{D}{E} \times 100\%$	E	
0.0	300	100	300	100	300	100	300	100	300	
8.0	280	93	300	100	310	100	320	107	300	
24.0	290	97	320	107	300	100	310	100	300	
48.0	260	87	280	93	300	100	310	103	300	
168.0	220	73	250	83	260	87	290	97	300	

(36)

特開昭55-141194 (10)



## 実施例 5

モウルカス I およびモウルカス II により記載された型の酵素標準組成物の多数のロットが米国特許第 4,158,544 号に示された改良手順に従って調製された。これらのロットはプラスチックびん中に貯蔵され、各種の温度に温置され、指定された時間間隔で 37°C で分析された。得られた結果は第 XX - XXXI 表に示されている。

第 XX 表は所定温度および時間における第 XX - XXX 表に示した各成分に対する貯蔵寿命を比較したものである。

第 XX 表

LDH: 人間血清アルブミンマトリックス中 pH 8.5

時間	41°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	
00	4020	100	4020	100	4020	100	4020	
40	3950	98	3930	98	3970	99	4020	
80	3800	96	3850	97	4020	101	3970	
240	4250	108	4420	113	4560	116	3920	
480	3590	89	3750	93	3820	95	4030	
720	4000	89	4220	94	4340	96	4500	
960	3380	87	3590	93	3740	97	3870	
1680	3800	85	3890	87	4170	93	4480	
3360	--N/A--		3470	88	3600	91	3950	

N/A は利用できないことを示す。

( 39 )

第 XX 表

ALP: 人間血清マトリックス中 pH 6.5

時間	41°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	
00	510	100	510	100	510	100	510	
40	540	106	540	106	540	106	510	
80	570	112	560	110	550	108	510	
240	500	94	540	102	570	108	530	
480	470	85	510	93	570	104	550	
720	370	70	460	87	520	98	530	
960	340	64	430	81	500	94	530	
1200	330	60	430	78	510	93	550	
1440	300	55	420	76	480	87	550	
3360	180	35	310	60	390	75	520	
5040	--N/A--		320	55	430	74	580	
12480	--N/A--		240	35	430	62	620	
20160	--N/A--		--N/A--		290	51	570	

N/A は利用できないことを示す。

( 41 )

-513-

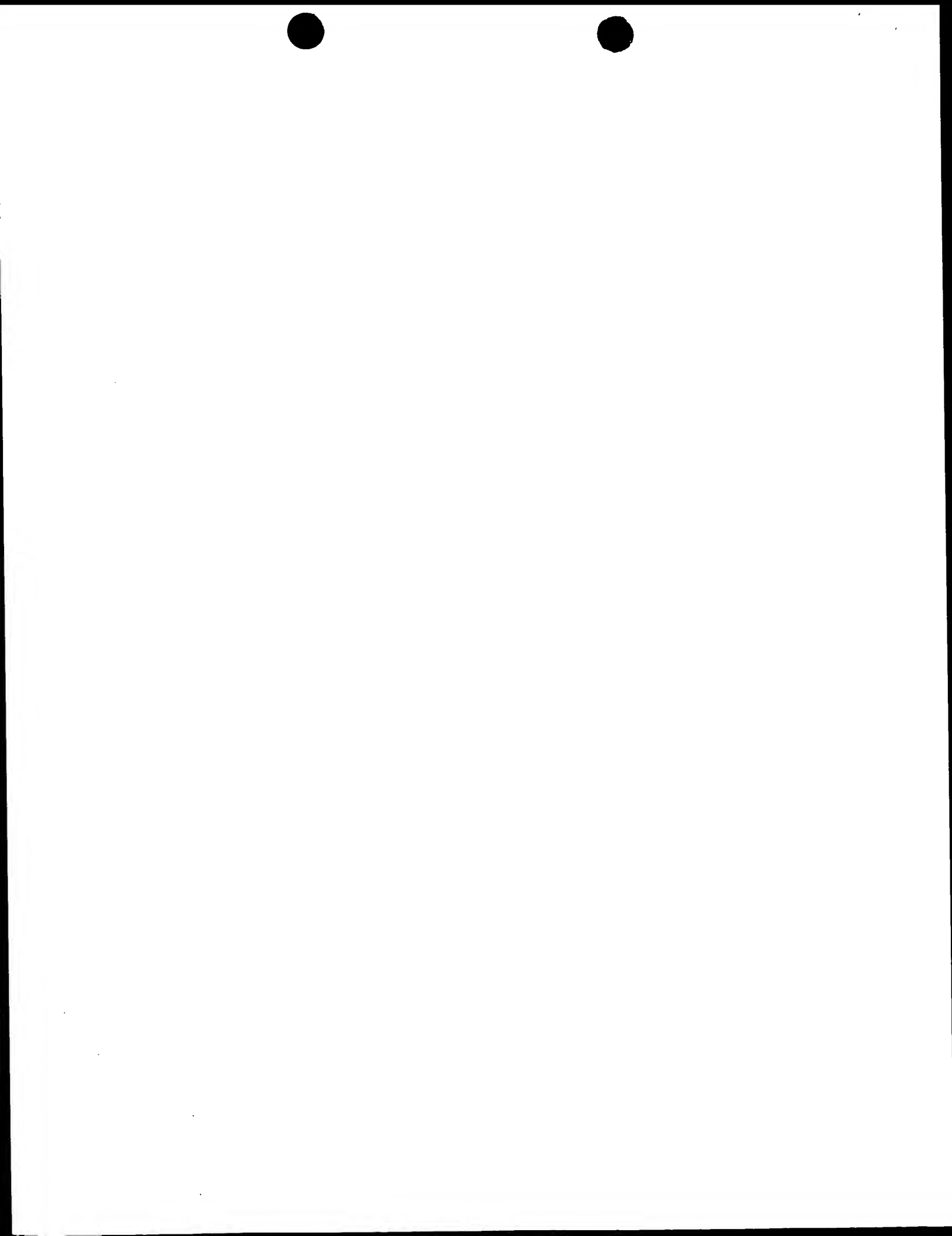
第 XX 表

ALP: 人間血清マトリックス中 pH 6.5

時間	41°C		37°C		32°C		-15°C	
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D	
00	2950	100	2950	100	2950	100	2950	
40	2980	101	2950	100	2940	100	2950	
80	2880	99	3090	106	3090	106	2910	
240	2630	89	--N/A--		2920	99	2940	
480	2350	76	2830	92	2920	94	3090	
720	2230	77	2950	102	3120	108	2890	
960	1870	64	2740	94	3020	103	2930	
1720	1140	39	2200	75	2580	88	2930	

N/A は利用できないことを示す。

( 42 )



第 XXV 表

SOOT:人間血清マトリックス中 pH 6.0

時間	41℃ A D	24℃ B D	4℃ C D	-15℃ D
00	1110 100	1110 100	1110 100	1110
10	1110 99	--N/A--	--N/A--	1110
20	1110 100	--N/A--	--N/A--	1110
30	1090 98	--N/A--	--N/A--	1110
40	1070 96	1120 101	1110 100	1110
50	1210 102	--N/A--	--N/A--	1180
60	1110 96	--N/A--	--N/A--	1180
70	1110 94	--N/A--	--N/A--	1180
80	1060 90	--N/A--	--N/A--	1180
90	1030 87	1210 102	1180 100	1180
100	860 76	--N/A--	--N/A--	1180
110	870 77	--N/A--	--N/A--	1180
120	910 80	--N/A--	--N/A--	1180
150	790 70	1080 96	1120 99	1180
200	420 38	1080 95	1130 100	1130
300	420 38	--N/A--	--N/A--	1130
400	360 32	1030 91	1120 99	1130
500	220 20	980 88	1110 99	1130
600	170 15	940 87	1120 99	1130
720	<50 N/A	950 84	1120 99	1130
800	<50 N/A	930 83	1120 100	1130

( # 5 )

N/Aは利用できないことを示す。

第 XXV 表

CK:人間血清マトリックス中 pH 6.5

時間	41℃ A D	37℃ B D	32℃ C D	-15℃ D
00	2780 100	2780 100	2780 100	2780
40	2860 103	2850 103	2810 101	2780
80	2600 87	2610 87	2630 88	3000
240	2100 73	2610 90	2720 94	2890
480	1560 53	2320 86	2690 92	2930
720	--N/A--	2380 83	2600 90	2880
960	--N/A--	2130 73	2470 85	2920
1210	--N/A--	1950 66	2410 82	2940
1440	--N/A--	1830 62	2360 80	2940
3360	--N/A--	1010 40	1670 65	2550
5040	--N/A--	--N/A--	1570 58	2700

( # 3 )

N/Aは利用できないことを示す。

第 XXV 表

CK:人間血清マトリックス中 pH 8.5

時間	41℃ A D	37℃ B D	32℃ C D	-15℃ D
00	1270 100	1270 100	1270 100	1270
40	1150 91	1290 102	1240 98	1270
80	710 55	1190 93	1320 102	1280
240	20 2	--N/A--	990 85	1170
480	--N/A--	280 24	830 71	1170
720	--N/A--	--N/A--	680 56	1220
960	--N/A--	--N/A--	560 43	1310

( # 4 )

N/Aは利用できないことを示す。

N/Aは利用できないことを示す。



第 XXX 表

LDH:人間血清マトリックス中pH6.5

時間	41℃			37℃			32℃			-15℃		
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D			D		
00	4300	100	4300	100	4300	100	4300			4300		
20	4200	98	4340	101	4260	99	4300			4300		
40	4560	101	4490	100	4580	102	4510			4510		
240	4230	91	4200	91	4420	95	4640			4640		
480	4610	103	4770	106	4410	98	4490			4490		
720	4130	92	4290	95	4590	102	4510			4510		
960	4000	89	4160	92	4370	97	4510			4510		
1200	4170	88	4380	92	4710	99	4740			4740		
1440	4170	87	4320	90	4620	97	4780			4780		
3360	3640	86	3720	88	4140	98	4230			4230		
5040	3520	84	3680	87	3950	94	4210			4210		

( # 9 )

-515-

第 XXV 表

SGPT:人間血清マトリックス中pH6.0

時間	41℃			25℃			4℃			-15℃		
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D			D		
00	160	102	160	102	160	102	160			160		
10	180	115	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			160		
20	190	121	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			160		
30	200	128	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			160		
40	200	100	180	90	200	100	200			200		
50	120	68	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			180		
60	130	74	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			180		
70	140	80	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			180		
80	130	85	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			180		
90	170	97	180	102	--N/A--	--N/A--	--N/A--			180		
100	220	90	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			240		
110	70	119	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			240		
120	290	119	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			240		
150	130	88	160	94	170	100	170			170		
240	110	75	290	119	130	53	130			240		
300	120	72	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			170		
360	100	60	160	95	170	101	170			170		
480	80	47	160	94	160	94	160			170		
560	80	42	160	84	170	89	170			170		
720	70	41	160	95	170	101	170			170		
800	<50	--N/A--	160	104	170	111	170			150		

N/Aは利用できないことを示す。

( # 7 )

特開55-141194 (13)

第 XXK 表

SGPT:人間血清マトリックス中pH8.5

時間	41℃			25℃			4℃			-15℃		
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D			D		
00	200	100	200	100	200	100	200			200		
10	180	95	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			200		
20	200	100	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			200		
30	200	100	220	101	210	96	210			200		
40	200	92	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			220		
50	120	55	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			220		
60	130	60	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			220		
70	130	69	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			220		
80	160	74	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			220		
90	180	83	200	92	220	101	220			220		
100	180	82	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			140		
110	<30	N/A	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			140		
120	130	91	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			140		
150	50	50	100	100	110	110	110			100		
240	80	56	150	104	150	104	150			180		
300	90	50	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--	--N/A--			180		
360	70	39	170	94	180	100	180			180		
480	<50	N/A	150	80	170	91	170			190		
560	<30	N/A	150	86	200	103	200			170		
720	<30	N/A	180	93	200	103	200			190		
800	<30	N/A	130	67	130	67	130			190		

N/Aは利用できないことを示す。

( # 8 )

第 XXX 表

LDH:人間血清マトリックス中pH8.5

時間	41℃			37℃			32℃			-15℃		
	A	$\frac{A}{D} \times 100\%$	B	$\frac{B}{D} \times 100\%$	C	$\frac{C}{D} \times 100\%$	D			D		
00	4880	100	4880	100	4880	100	4880			4880		
20	4760	98	4870	100	6780	98	4880			4880		
40	5040	105	5290	110	5310	110	4820			4820		
240	4380	89	--N/A--	--N/A--	4760	97	4910			4910		
480	4360	88	4710	95	4820	97	4980			4980		
720	4780	92	5030	97	5210	100	5200			5200		
960	4280	81	4720	90	5040	96	5270			5270		
1720	4050	78	4510	86	4700	90	5220			5220		
3160	3530	69	4040	79	4490	87	5140			5140		
4840	3090	59	4060	78	4840	93	5210			5210		
12040	1060	20	2090	39	4250	80	5300			5300		

N/Aは利用できないことを示す。

( # 0 )





第 XXV 表

成分	pH	温度(℃)/時間(時)	%回収率	
			人 アルブミン マトリックス	人 間 血 マトリックス
ALP	6.5	41/144	78%	55%
ALP	8.5	41/96	97%	64%
CK	6.5	41/48	55%	53%
CK	8.5	41/24	13%	2%
SGOT	6.0	41/48	92%	20%
SGOT	8.5	41/72	98%	50%
SGPT	6.0	41/48	87%	47%
SGPT	8.5	41/24	79%	56%
LDH	6.5	41/505	84%	84%
LDH	8.5	41/96	87%	81%

(51)

特開昭55-141194(14)

第 XXV 表は、pH に関係なく、酵素は本発明の人間血清アルブミンマトリックス中に貯蔵された場合にモウルカス I およびモウルカス II の組成物の先行技術人間血清マトリックス中に貯蔵された場合よりも顕著に改良された貯蔵寿命を発揮することを示している。

この開示に基づいて、多くの他の改変や分岐が当業者には当然示唆されるであろう。これらはこの発明の範囲内にあるものと理解されるべきである。

(52)

